

Aus dem pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

Histomorphologische und immunhistochemische
Untersuchungen an Adnexektomiepräparaten von
BRCA1- und BRCA2-Keimbahnmutationsträgerinnen:
Können Vorläuferläsionen
ovarieller Tumoren nachgewiesen werden?

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin

vorgelegt von

Katrin Hecker

aus

Kelheim

Jahr

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Doris Mayr

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Julia Jückstock

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. Elisa Schmoeckel

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1.1 Tumoren des Ovars	1
1.1.1 Benigne seröse epitheliale Tumoren	2
1.1.2 Seröser epithelialer Borderline-Tumor	3
1.1.3 Maligne seröse epitheliale Tumoren	5
1.3 BRCA1 und BRCA2	13
1.3.1 Epidemiologie	13
1.3.2 Genfunktion	14
1.3.3 Familienanamnese	15
1.3.4 Molekulargenetische Analyse	15
1.3.5 Prävention	16
1.3.6 Therapeutische Aspekte	17
1.4 Untersuchte Proteine	17
1.5 Fragestellung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Patientenkollektiv	22
2.3 Untersuchungsmaterialien	28
2.3.1 Verbrauchsmaterialien	28
2.3.2 Geräte	28
2.3.3 Chemikalien	29
2.3.4 Antikörper	30
2.4 Grundlagen der Immunhistochemie	31
2.5 Methode	32
2.5.1 Aufarbeitung der Gewebeproben	32
2.5.2 Schneiden der Gewebeproben	32
2.5.3 Entparaffinierung	32
2.5.4 Vorbehandlung	33
2.5.5 Blockade der endogenen Peroxidasen	33
2.5.6 Immunhistochemische Färbungen	33
2.6 Mikroskopische Auswertung	34
2.7 Statistische Auswertung	34
3. Ergebnisse	35
3.1 Versuchsgruppe	35
3.1.1 Auswertbarkeit der Untersuchungen	35
3.1.2 Histomorphologische Veränderungen	35

3.1.3 PAX8.....	36
3.1.4 PAX2.....	38
3.1.5 Lef1.....	41
3.1.6 β -Catenin.....	43
3.1.7 ARID1A.....	44
3.1.8 p53.....	45
3.1.9 KI67	45
3.1.10 p16.....	45
3.11 Vergleich mit der Kontrollgruppe.....	48
4. Diskussion	61
5. Zusammenfassung	70
Literaturverzeichnis.....	72

Abkürzungsverzeichnis

5-/10-JÜR	5-/10-Jahres-Überlebensrate
ABC	Avitin-Biotin-Complex
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
APST	Atypischer proliferativer seröser Tumor
ARID1A	AT Rich Interactive Domain 1A
BMI	Body Mass Index
BRCA	Breast-Cancer-Gen
BOT	Borderline-Ovarialtumor
CIC	Cortical inclusion cyst
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
CUK	Chromatin-Umgestaltungskomplex
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
HBOC	Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrom
HE	Hämatoxilin-Eosin
HET	Hormonersatztherapie
HGSC	High-grade seröse Karzinome
HGSOC	High-grade seröses Ovarialkarzinom

HMG	High mobility group protein
HPV	Humane Papillomviren
IRS	Immunreaktiver Score nach Remmele
Lef1	Lymphoid enhancer binding factor
LGSC	Low-grade seröse Karzinome
LGSOC	Low-grade seröses Ovarialkarzinom
OC	Ovarialkarzinom
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PAX2	Paired-Box 2
PAX8	Paired-Box 8
PBSO	Prophylaktische bilaterale Salpingo-Oophorektomie
PCOS	Polyzystischem Ovarialsyndrom
SCOUT	Secretary cell outgrowth
SEI	Surface epithelial inclusion
STIC	Seröses tubares intraepitheliales Karzinom
Tcf	T cell factor
Tris	Tris(ydroxymethyl)-aminomethan
UICC	Union Internationale contre le Cancer
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1 Tumoren des Ovars

Die Tumoren des Ovars werden nach der World Health Organization (WHO) klassifiziert. Sie werden eingeteilt in epitheliale Tumoren, die mit 60 Prozent den größten Teil ausmachen, in Keimzelltumoren (20 %) und in Keimstrang-Keimdrüsen-Tumoren (5 %). Außerdem können in den Eierstöcken auch Metastasen aus anderen Organen, wie zum Beispiel dem übrigen Genitaltrakt, dem Gastro-Intestinal-Trakt oder der Mamma vorkommen [Weyerstahl, 2013]. Die epithelialen Neoplasien werden wiederum in seröse, muzinöse, seromuzinöse, endometrioide, Klarzelltumoren und weitere, seltenere Formen untergliedert [Kurman, 2014]. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die WHO-Klassifikation der epithelialen Tumoren des Ovars.

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der epithelialen Tumoren des Ovars, nach [Kurman, 2014]

<i>Seröse Tumoren</i>
Seröses Zystadenom, Adenofibrom, Oberflächenpapillom
Seröser Borderline-Tumor (atypisch proliferativer seröser Tumor, nicht-invasives Low-grade seröses Karzinom)
High-grade seröses Karzinom, Low-grade seröses Karzinom
<i>Muzinöse Tumoren</i>
Muzinöses Zystadenom, Adenofibrom
Muzinöser Borderline-Tumor
Muzinöses Karzinom
<i>Endometrioide Tumoren</i>
Endometrioide Zyste, Zystadenom, Adenofibrom

Endometrioider Borderline-Tumor

Endometrioides Karzinom

Klarzelltumoren

Klarzell-Adenofibrom, -Zystadenom

Klarzell-Borderline-Tumor

Klarzell-Karzinom

Brenner-Tumoren

Benigner Brenner-Tumor

Borderline-Brenner-Tumor

Maligner Brenner-Tumor

Seromuzinöse Tumoren

Seromuzinöses Zystadenom, Adenofibrom

Seromuzinöser Borderline-Tumor

Seromuzinöses Karzinom

Undifferenzierte Karzinome

Die Gruppe der epithelialen serösen Tumoren ist diejenige, die mit 60 Prozent aller Ovarialtumoren am häufigsten vorkommt [Weyerstahl, 2013]. Deshalb soll diese im Folgenden ausführlicher beschrieben werden.

1.1.1 Benigne seröse epitheliale Tumoren

Zu den benignen Neoplasien des Subtyps der serösen epithelialen Tumoren zählen das Zystadenom, das Adenofibrom und das Oberflächenpapillom. Sie treten vorwiegend im Alter von 40 bis 60 Jahren auf und verlaufen asymptomatisch. Makroskopisch lassen sich eine oder mehrere dünnwandige Zysten erkennen, die mit einer klaren, wässrigen Flüssigkeit gefüllt sind. Der Durchmesser ist variabel (1 bis 30 cm) [Kurman, 2014].

Mikroskopisch besteht das Zystadenom aus Zysten oder Papillen, die aus ein- oder mehrschichtigen kubischen und hochprismatischen Zellen und teilweise Zilien aufgebaut sind. Diese sind dem Tubenepithel sehr ähnlich. Das Zystadenofibrom besitzt zusätzlich fibröses Stroma (Abb. 1). Das Oberflächenpapillom ist aus papillärem serösen Epithel, das der Oberfläche des Ovars aufsitzt, aufgebaut. Die benignen Tumoren weisen keine KRAS- und BRAF-Mutationen auf, wie etwa der Borderline-Ovarialtumor (BOT) oder das Low-grade seröse Ovarialkarzinom (LGSOC, siehe unten). Eine genetische Disposition ist nicht bekannt [Kurman, 2014].



Abbildung 1: Seröses Zystadenofibrom, nach [Kurman, 2014]

1.1.2 Seröser epithelialer Borderline-Tumor

Die semimaligen Formen der serösen epithelialen Tumoren werden auch als BOT oder Atypischer proliferativer seröser Tumor (APST) bezeichnet [Kurman, 2014]. Diese werden nach der WHO definiert als Läsionen, die histologisch einige, aber nicht alle Charakteristika der Malignität aufweisen. 25 Prozent der Ovarialtumoren können dieser Gruppe zugeordnet werden [Ewald-Riegler, 2012]. BOTs sind nicht invasiv wachsende Tumoren, die eine höhere epitheliale Proliferation und mehr zytologische Atypien aufweisen als gutartige Neoplasien, jedoch geringere als LGSOCs (Abb. 2). Es wird davon ausgegangen, dass sie mit einem erhöhten Risiko der Transformation in LGSOCs einhergehen [Kurman, 2014]. Häufig werden BOT's unilateral und im Gegensatz zum invasiven Ovarialkarzinom im mittleren Lebensalter, ungefähr mit 45 bis 55 Jahren, diagnostiziert [Ewald-Riegler, 2012].

Insgesamt haben sie eine geringere Inzidenz als High-grade seröse Ovarialkarzinome (HGSOC) und weisen keine Assoziation zu den Breast cancer (BRCA) - Genen auf. Makroskopisch charakterisieren sie sich durch mehr als 5 cm große Zysten. Mikroskopisch stellt sich ein Muster aus Verzweigungen aus Papillen in unterschiedlichsten Größen dar. Diese sind aus ein- und mehrschichtigen kubischen und rautenförmigen Zellen mit eosinophilem Zellplasma und hyperchromatischen Zellkernen aufgebaut. Auch Oberflächenzilien sind zu sehen. BOTs exprimieren immunhistochemisch vor allem PAX8 und p53 - p16 kennzeichnet sie nicht. Weiterhin konnten Mutationen der KRAS- und BRAF-Gene nachgewiesen werden [Kurman, 2014]. Eine einseitige Adnexektomie ist bei Frauen mit Kinderwunsch vertretbar. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass ein solches fertilitätserhaltende Vorgehen anstatt einer PBSO mit höheren Rezidivraten assoziiert ist [S3-Leitlinie Ovarialkarzinom, 2013]. Eine adjuvante Chemotherapie ist nicht indiziert. Die Prognose ist gut, wie sich an der 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) mit 80 Prozent erkennen lässt [Weyerstahl, 2013].

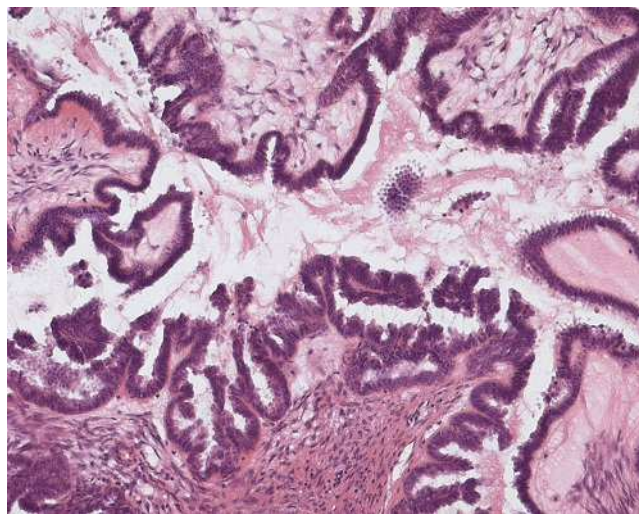


Abbildung 2: Seröser Borderline-Tumor des Ovars, nach [Uni Basel, BOT]

1.1.3 Maligne seröse epitheliale Tumoren

Die malignen serösen epithelialen Tumoren können eingeteilt werden in das HGSOE, den Typ-I-Tumor, sowie das LGSOC, den Typ-II-Tumor. Das LGSOC ist gekennzeichnet durch KRAS- und BRAF-Mutationen und das HGSOE durch p53-Mutationen und eine erhöhte genetische Instabilität [Kurman, 2014].

LGSOC

Das LGSOC ist ein invasiver Tumor mit niedrigmalignen zellulären Atypien (Abb. 3). Er macht fünf Prozent der serösen Karzinome aus und tritt oft bilateral und ungefähr ein Jahrzehnt früher als das HGSOE, also zwischen 50 und 60 Jahren, auf. Mikroskopisch zeigt es ein papilläres Wachstum. Weiterhin kann ein sehr unterschiedliches Muster aus einzelnen Zellen, Zellnestern und Mikro- und Makropapillen erkannt werden. Das LGSOC weist viele Komponenten des BOTs auf. Im Gegensatz zum HGSOE wird es durch eine einheitlichere Population kleiner Zellen mit einem weniger stark ausgeprägten nukleären Polymorphismus gekennzeichnet. Außerdem werden keine Nekrosen, jedoch häufig viele Psammomkörper gefunden. Die mitotische Aktivität ist insgesamt geringer als im HGSOE. Das LGSOC wird chirurgisch und je nach Tumorstadium und Tumorausmaß postoperativ chemotherapeutisch behandelt. Die 5-JÜR beträgt dabei 85 Prozent, die 10-Jahres-Überlebensrate (10-JÜR) 50 Prozent [Kurman, 2014]. Molekular wird das LGSOC vor allem durch KRAS-, BRAF-Mutationen, sowie eine PAX2-, Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptor-Überexpression charakterisiert [Groen, 2015].

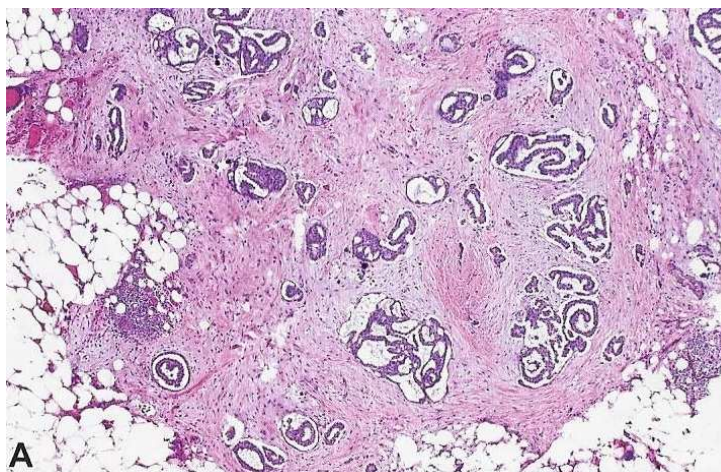


Abbildung 3: Low-grade seröses Ovarialkarzinom, nach [Kurman, 2014]

HGSOC

Da das HGSOC (Abb. 4) mit 70 Prozent als das häufigste Ovarialkarzinom (OC) gilt [Meinhold-Heerlein, 2015] und die in der vorliegenden Arbeit untersuchten BRCA-Genmutationen fast ausschließlich mit diesem Subtyp assoziiert werden [Garg, 2013], wird dieses im folgenden Abschnitt ausführlicher beschrieben.

Epidemiologie und Risikofaktoren

Mit 4,5 Prozent stellt das HGSOC einen bedeutenden Teil aller malignen Tumoren der Frau dar, auch wenn der Anteil deutlich kleiner ist als beispielsweise das Mammakarzinom mit 25 Prozent [Kurman, 2014]. Die Inzidenz in Deutschland beträgt ungefähr 18 pro 100 000 Frauen pro Jahr. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 70, wobei die Erkrankungsraten bis zum 85. Lebensjahr kontinuierlich ansteigen [RKI, 2014]. Nur 10 Prozent der Erkrankten sind bei Diagnosestellung unter 40 Jahre alt [Weyerstahl, 2013]. Die 5-JÜR lag im Jahr 2014 bei etwa 41 Prozent, die Mortalität betrug ungefähr 13 Prozent [RKI, 2014]. Die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des malignen Tumors setzen sich zusammen aus der genetischen Veranlagung und exogenen Einflüssen. Das Risiko sowohl für ein Mammakarzinom als auch für ein Ovarialkarzinom steigt durch die Gene BRCA1 und BRCA2 an [Al Bakir, 2014]. Weitere Risikofaktoren sind das Alter, ein hoher Body Mass Index (BMI) sowie Endometriosen [Burghaus, 2015]. Protektiv wirkt die Einnahme oraler Kontrazeptiva, sowie die Anzahl der Schwangerschaften [Kurman, 2014].

Makroskopie und Mikroskopie

Das HGSOC hat einen variablen Durchmesser und zeigt eine hochgradige nukleäre Atypie in den epithelialen Zellen. Makroskopisch lassen sich papilläre und solide Anteile sowie Zysten, Nekrosen und Blutungen erkennen. Oft tritt es bilateral auf. Mikroskopisch besteht es aus einer kompakten Masse von papillären, glandulären und kribriformen atypischen Zellverbänden. Die Zellen besitzen große, hyperchromatische und pleomorphe Zellkerne, oft sind eosinophile Nucleoli vorhanden. Außerdem lassen sich häufig atypische Mitosen und Psammomkörper finden [Kurman, 2014].

Immunhistochemisch konnte eine aberrante p53-Expression nachgewiesen werden, nämlich entweder eine komplette Abwesenheit des Proteins, die durch eine Nonsense-Mutation des *TP53*-Gens bedingt ist oder eine starke, diffuse Färbung von mehr als 60 Prozent der Zellen, die durch eine Missense-Mutation entsteht. Oft sind die BRCA-Gene inaktiviert [Kurman, 2014]. Weiterhin auffällig sind p16- sowie Ki67-Überexpressionen [Groen, 2015].

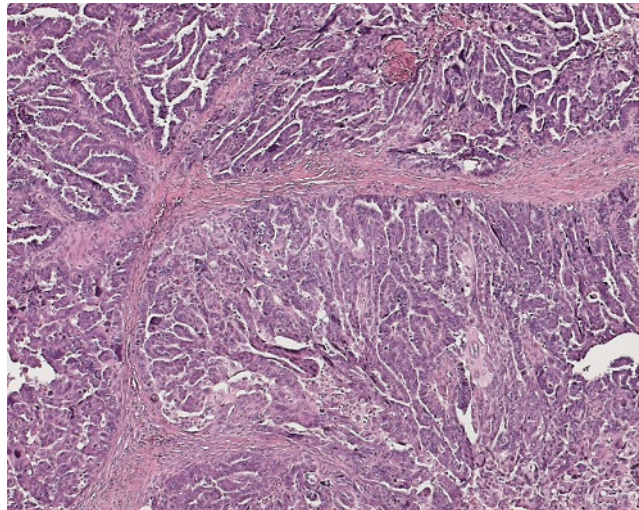


Abbildung 4: High-grade seröses Ovarialkarzinom, nach [Uni Basel, HGSOC]

Pathogenese

Das Oberflächenepithel des Ovars, das Müller-Epithel, besteht aus einer einzelnen Schicht modifizierter Mesothelzellen, die kubisch bis hochprismatisch sind [Kurman, 2011], (Abb. 5). Früher ging man davon aus, dass dieses Oberflächenepithel oder das Epithel kortikaler Inklusionszysten [Gross, 2010], (Abb. 6) Ursprung seröser Neoplasien sind. Man vermutete, dass sich die Zysten auf Grund von Ovulationstraumen durch Surface epithelial inclusions (SEIs), also Einstülpungen des Oberflächenepithels, bildeten [Kurman, 2011]. Es wurde angenommen, dass es von peritonealem Oberflächenepithel ausgekleidete Hohlräume waren, die nach der Ovulation und aus den damit verbundenen Rupturen im Epithel entstanden [Remmele, 1997]. In der Zwischenzeit wurde aber nachgewiesen, dass zumindest ein Teil der CICs morphologisch und immunhistologisch eine große Ähnlichkeit mit dem Tubenepithel aufweisen und deswegen eher auf Einsprengungen dessen zurückzuführen sind [Kurman, 2014].

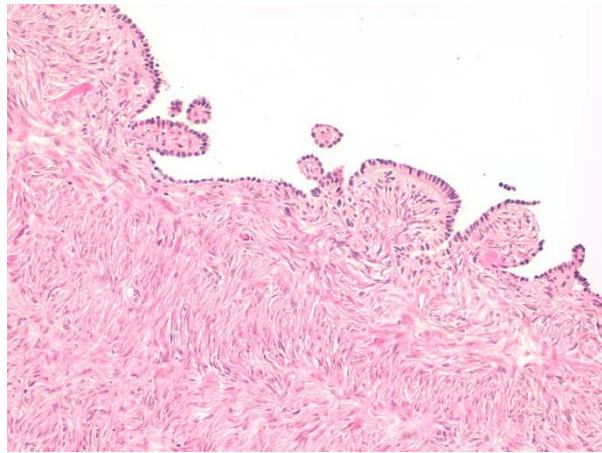


Abbildung 5: Papillomatös verändertes Oberflächenepithel, HE-Färbung, 200-fach vergrößert

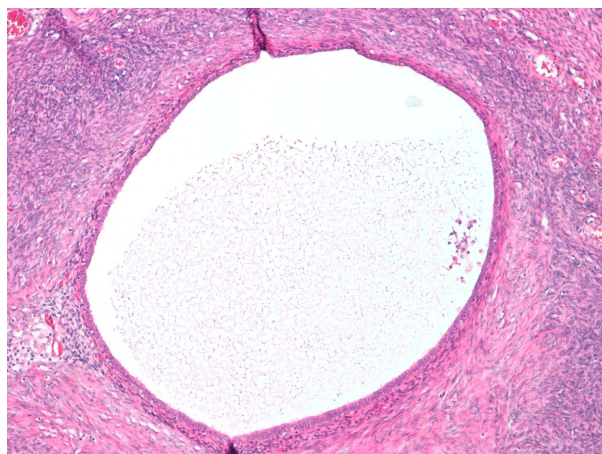


Abbildung 6: Kortikale Inklusionszyste, HE-Färbung, 100-fach vergrößert

Außerdem wird eine extraovarielle, also primär mesotheliale Genese für das OC diskutiert. Damit ist die Entstehung etwa aus Endosalpingiosen gemeint [Remmele, 1997]. Der Begriff der Endosalpingiosen bezeichnet Epithelzellen vom tubären Typ, die außerhalb der Tuben liegen. Sie kommen im Peritoneum und subperitonealem Gewebe vor und werden meist zufällig entdeckt [Kurman, 2011]. Makroskopisch kann man teilweise fokale, granuläre Erhebungen oder kleine Zysten erkennen. Mikroskopisch werden runde oder ovale Drüsen, die von zilientragendem Epithel ausgekleidet sind, gefunden (Abb. 7). Weiterhin bezeichnend sind Psammomkörper, manchmal auch eine verstärkte Proliferation und Stratifikation des Epithels, kleine Papillen und nukleäre Atypien [Klöppel, 2013]. Endosalpingiosen und andere gutartige, glanduläre Läsionen kommen bei ungefähr 40 % aller Frauen vor [Kurman, 2011]. Außer im Ovar können sie im Peritoneum oder auch in pelvinen Lymphknoten gefunden werden [Kurman, 2014].

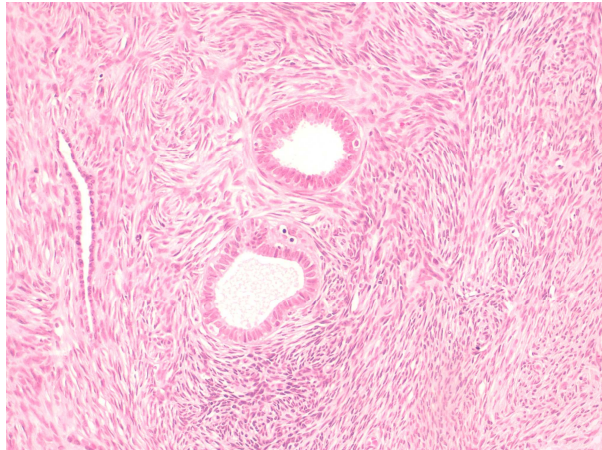


Abbildung 7: Endosalpingiose, HE-Färbung, 200-fach vergrößert

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem rein quantitativ das Vorliegen von Follikelzysten untersucht. Follikelzysten sind funktionelle Zysten des Ovars. Sie haben einen Durchmesser von 3 bis 8 cm, sind dünnwandig und kommen meist unilokulär vor [Kurman, 2011], siehe Abb. 8 und 9. Sie lassen sich in den meisten, allerdings nicht allen, ovariellen Krebsläsionen finden. Bei einer Endometriose treten Follikelzysten am häufigsten auf, bei Zystadenomen am seltensten [Pavone, 2014].

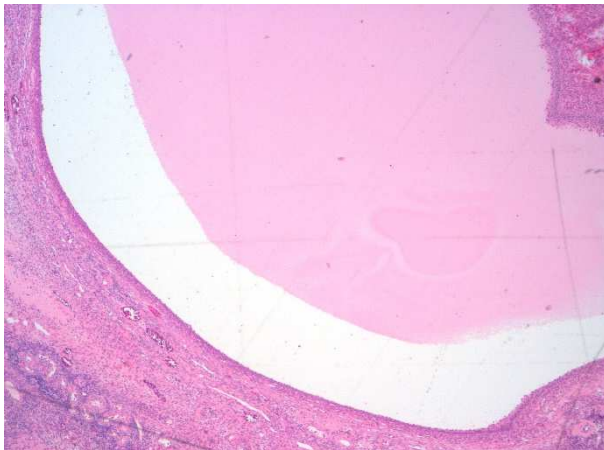


Abbildung 8: Follikelzyste, HE-Färbung, 40-fach vergrößert

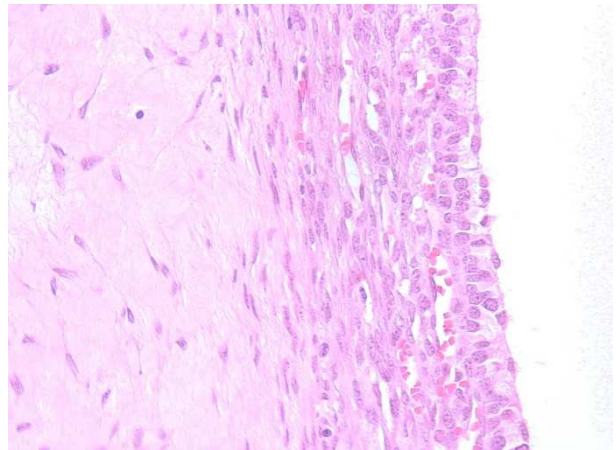


Abbildung 9: Follikelzyste, HE-Färbung, 400-fach vergrößert

Häufig entstehen HGSOCS auch in den Tuben selbst. In den im Zuge der prophylaktischen bilateralen Salpingo-Oophorektomie (PBSO) entnommenen Adnexen findet man mehr kleine Karzinome in den Tuben als in den Ovarien. Bei über 60 Prozent der Frauen mit HGSOCS sind Seröse Tubare Intraepitheliale Karzinome (STICs) in den Tuben vorhanden. Die STICs und High-grade serösen Karzinome der Tuben weisen hohe Proliferationsraten, eine genomische Instabilität und häufig p53-Mutationen auf [Kurman, 2014].

Diagnostik und Staging

Für eine frühzeitige Diagnose von Ovarialkarzinomen stehen keine effektiven Screening-Methoden zur Verfügung. Als sehr spät auftretende Symptome können sich bei den erkrankten Patientinnen Völlegefühl, Blähungen, abdominelle Schmerzen und eine Zunahme der Miktionsfrequenz einstellen. Kommt eine Frau mit der Verdachtsdiagnose eines OCs in die Praxis, kann die Familienanamnese Auskunft über genetische Vorbelastungen geben. Außerdem werden die üblichen gynäkologischen Untersuchungen durchgeführt, wie etwa die gynäkologische Spiegel- und Tastuntersuchung sowie die Transvaginalsonografie [S3-Leitlinie Ovarialkarzinom, 2013]. Weitere bildgebende Verfahren, wie eine Computertomografie, sowie ein Röntgen-Thorax und ein Röntgen-Abdomen werden für die Metastasensuche angewandt. Weiterhin werden Bluttests durchgeführt, mit denen unter anderem das Level von CA-125, dem, wenn auch unspezifischen, Tumormarker für das HGSOCS, festgestellt werden kann [Al Bakir, 2014]. Das Tumorstaging wird operativ durchgeführt. Es erfolgt nach den Kriterien der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO). Diese Einteilung wurde von der Union Internationale contre le Cancer (UICC) für die TNM-Klassifikation fast identisch übernommen. 2014 wurde ein neuer Entwurf von der FIGO vorgestellt, der aber bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht von der UICC übernommen wurde [Höhn, 2014]. In der nachfolgenden Tabelle werden die einzelnen FIGO-Stadien mit der jeweiligen TNM-Angabe beschrieben.

Tabelle 2: FIGO-Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms, nach [Kurman, 2014]

FIGO	TNM	
	TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
	T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Stadium I	T1	Tumor begrenzt auf Ovarien
Stadium IA	T1a	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars; keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
Stadium IB	T1b	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; Kapsel intakt, kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien; keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
Stadium IC	T1c	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur, Tumor an der Ovaroberfläche oder maligne Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
Stadium II	T2	Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
Stadium IIA	T2a	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n); keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
Stadium IIB	T2b	Ausbreitung auf andere Beckengewebe; keine malignen Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
Stadium IIC	T2c	Ausbreitung im Becken (2a oder 2c) und maligne Zellen in Aszites oder bei Peritonealspülung
Stadium III	T3 und/oder N1	Tumor befällt ein oder beide Ovarien mit mikroskopisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder Lymphknotenmetastasen
Stadium IIIA	T3a	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
Stadium IIIB	T3b	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des

FIGO	TNM	
		Beckens, größte Ausdehnung 2 cm oder weniger
Stadium IIIC	T3c und/oder N1	Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung mehr als 2 cm und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen
Stadium IV	M1	Fernmetastasen (ausschließlich Peritonealmetastasen)

Therapie und Prognose

Die Karzinomanteile werden mit Hilfe einer medianen Laparotomie operativ entfernt. Dabei werden die erkrankten Adnexe sowie eventuell tumorbefallene Teile der Blase, des Darms, des Zwerchfells, des Peritoneums und der Milz entnommen. Wenn nötig sollte zusätzlich eine paraaortale sowie eine pelvine Lymphonodektomie durchgeführt werden. Hat die Patientin ein noch junges Alter und liegt ein Kinderwunsch vor, kann bei einem Tumor im FIGO-Stadium Ia eine fertilitätserhaltende Operation durchgeführt werden. Das Rezidivrisiko liegt hierbei allerdings bei 5-7 Prozent. Bei älteren Frauen und bei Tumoren in höheren Stadien muss eine radikale, das heißt beidseitige Adnexektomie erfolgen [Weyerstahl, 2013]. Die Prognose für das HGSOE ist in den meisten Fällen ungünstig, da es auf Grund der fehlenden Diagnosemöglichkeiten und spät einsetzenden Symptomatik häufig erst spät erkannt wird [Al Bakir, 2014]. Prognosefaktoren sind das Tumorstadium bei Diagnose, der postoperativ verbliebene Tumorrest, das Alter und der Allgemeinzustand der Patientin, der histologische Typ sowie das histologische Tumorgading [S3-Leitlinie Ovarialkarzinom, 2013]. Das Tumorstadium wird hierbei als wichtigstes Kriterium angesehen [Kurman, 2014]. Die 5-JÜR beträgt in den höheren Stadien (III und IV), wenn sich der Tumor bereits abdominell ausgebreitet hat, unter 40 Prozent, in den Stadien I bis IIA, wenn also eine Begrenzung auf die Ovarien vorliegt, dagegen noch über 80 Prozent [Tumormanual, 2014]. Zur Nachsorge werden eine ausführliche Anamnese, die gynäkologische Spiegel- und Tastuntersuchung, die rektale Untersuchung und die Vaginalsonografie empfohlen. Eine routinemäßige Bestimmung des Tumormarkers CA-125 bringt keine Vorteile [S3-Leitlinie Ovarialkarzinom, 2013].

1.3 BRCA1 und BRCA2

Allgemein wird unterschieden zwischen dem sporadisch und dem hereditär auftretenden Ovarialkarzinom. Bei etwa 10 bis 15 Prozent der Patientinnen kann von einer vererbten Genmutation ausgegangen werden [Tumormanual, 2014]. 20 Prozent der an einem HGSOE erkrankten Patientinnen sind BRCA-Mutationsträgerinnen [Hennessy, 2010]. Aus diesem Grund soll im Folgenden genauer auf die Gene BRCA1 und BRCA2 eingegangen werden.

1.3.1 Epidemiologie

Mutationen in den BRCA-Genen können zum Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC-Syndrom), also zu einem vererbten Brust- und Ovarialkarzinomsyndrom, führen. Der Erbgang ist autosomal-dominant [Al Bakir, 2014]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 50 bis 55 Jahren. Das Risiko für BRCA1-Trägerinnen, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, beträgt 40 Prozent, für BRCA2-Trägerinnen 11 Prozent. Im Vergleich dazu liegt es in der Normalbevölkerung bei 1,5 Prozent [Tumormanual, 2014]. Die kumulativen Risiken der Entwicklung eines Mamma- und Ovarialkarzinoms bei BRCA1- und BRCA2-Trägerinnen sind in Abb. 10 und 11 dargestellt.

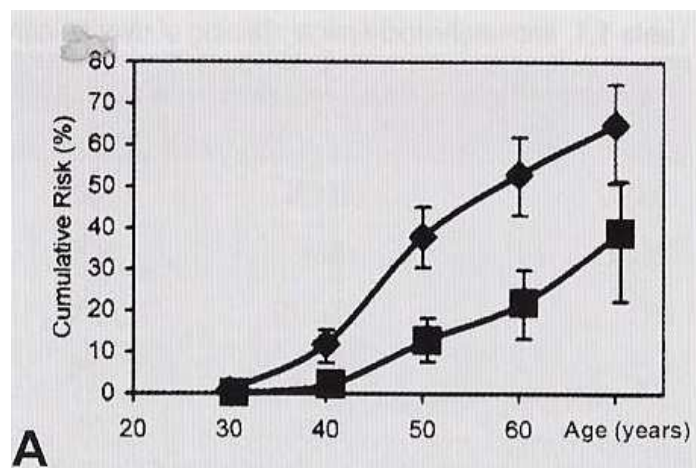


Abbildung 10: Kumulatives Risiko für Mamma- und Ovarialkarzinome bei BRCA1-Genmutationen, nach [Kurman, 2014]

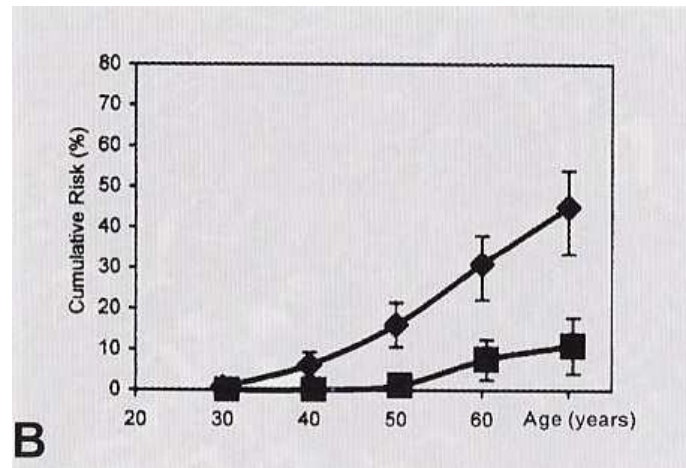


Abbildung 11: Abbildung: Kumulatives Risiko für Mamma- und Ovarialkarzinome bei BRCA2-Genmutationen, nach [Kurman, 2014]

1.3.2 Genfunktion

Die Gene BRCA1 und BRCA2 zählen zu den Tumorsuppressorgenen und sind an der DNA-Reparatur beteiligt [Al Bakir, 2014]. Sie reparieren DNA-Doppelstrangbrüche und sind für die Integrität des Genoms verantwortlich [Venkitaraman, 2004]. Es entstehen Doppelstrangbrüche, weil die DNA-Reparatur nicht über die homologe Rekombination abläuft, sondern durch alternative, nicht konservative Reparaturmechanismen [Konstantinopoulos, 2010]. Weitere Funktionen der BRCA-Gene sind die Zellzykluskontrolle, die Proteinubiquitinierung und das Chromatin-Remodelling [Russo, 2009]. Mögliche Veränderungen sind Keimzellmutationen (in 14,5 Prozent der HGSOCS), Promoter-Methylationen (in 11 Prozent der HGSOCS) und somatischen Mutationen (in 6 Prozent der HGSOCS) [CGARN, 2011]. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die beiden Gene, ihren Genort auf dem Chromosom und ihre vererbten Tumorerkrankungen.

Tabelle 3: BRCA-assoziierte Karzinome nach [Gevensleben, 2010]

Syndrom	Chromosom/Gen	Primärtumor	Sekundärtumor
Familiäres Mamma-/ Ovarialsyndrom	17q21 BRCA1	Mammakarzinom, Ovarialkarzinom	Kolonkarzinom, Prostatakarzinom
Familiäres Mamma-/ Ovarialsyndrom	13q12 BRCA2	Mammakarzinom, Ovarialkarzinom	Männliches Mammakarzinom, Uterus-, Prostata-, Oropharynx-, Pankreaskarzinom

1.3.3 Familienanamnese

BRCA-Genmutationen werden häufig in folgenden Konstellationen in der familiären Vorgeschichte beobachtet:

1. Mindestens zwei Frauen in der Familie sind an einem Mammakarzinom erkrankt und davon mindestens eine Verwandte ersten Grades vor dem 51. Lebensjahr.
2. Es ist eine Verwandte ersten Grades mit bilateralem, prämenopausalen Mammakarzinom in der Familie bekannt.
3. Es gibt einen an Mammakarzinom erkrankten männlichen Verwandten ersten Grades (Vater, Bruder, Sohn) in der Familie [Tumormanual, 2014].

1.3.4 Molekulargenetische Analyse

Um herauszufinden, ob eine solche Genmutation vorliegt, kann vom Deutschen Konsortium Familiärer Brust- und Eierstockkrebs, einem Verbund mehrerer Universitäten in Deutschland für familiär vorbelastete Patientinnen, eine molekulargenetische Analyse durchgeführt werden. Diese sollte einer Patientin dann angeboten werden, wenn aus ihrer Familienanamnese bekannt ist, dass

1. drei Frauen unabhängig vom Alter an Mammakarzinom,
2. zwei Frauen an Mammakarzinom, davon eine unter dem 51. Lebensjahr,
3. eine Frau an Mammakarzinom und eine Frau an Ovarialkarzinom,
4. zwei Frauen an Ovarialkarzinomen,
5. eine Frau an Mamma- und Ovarialkarzinom,
6. eine Frau mit 35 Jahren oder jünger an Mammakarzinom,
7. eine Frau mit 50 Jahren oder jünger an bilateralem Mammakarzinom,
8. ein Mann an Mammakarzinom und eine Frau an Mamma- oder Ovarialkarzinom

erkrankt ist/sind [S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2012].

Eine Genanalyse hat den Vorteil, Schritte zur Früherkennung und Prävention einleiten zu können. Ein systematisches Früherkennungsprogramm, also regelmäßige vaginale Ultraschalluntersuchungen oder eine konstante Überprüfung des Tumormarkers CA-125, der bei Ovarialkarzinomen im Blutserum nachweisbar ist, scheinen allerdings nicht sinnvoll zu sein [Petrucelli, 1998]. Andere Maßnahmen, wie die im nächsten Kapitel beschriebene chirurgische und medikamentöse Prophylaxe, stellen dagegen eine gängige Option zur Vorsorge dar.

1.3.5 Prävention

Als chirurgische Präventionsmaßnahme wird die prophylaktische bilaterale Salpingo-Oophorektomie (PBSO) empfohlen. Es ist bewiesen, dass sie das Risiko von BRCA-Mutationsträgerinnen, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, erheblich reduziert. Bei Patientinnen, die bei der PBSO noch nicht erkrankt sind, sinkt es um 80 Prozent [Kauff, 2008]. Durchgeführt wird diese, indem die Ovarien und Tuben beidseits operativ entfernt werden. Auf Grund der somit fehlenden Hormondrüsen muss eine Hormonersatztherapie (HET) mit Östrogen und Progesteron angeschlossen werden. Der empfohlene Zeitpunkt einer PBSO wird bei BRCA1-Trägerinnen mit Ende 30, Anfang 40 empfohlen. Bei BRCA2-Trägerinnen sollte sie zu Beginn der Menopause, also mit Anfang 50, erfolgen.

Eine Nebenwirkung, die nach der chirurgischen Entfernung der Adnexen trotz HET auf Grund des Hormonmangels auftritt, ist ein höheres Risiko für Osteoporose sowie vaskuläre Erkrankungen, wie etwa Hypercholesterinämie, Bluthochdruck und Diabetes mellitus [Kauff, 2007]. In den entnommenen Adnexen wurden schon häufig Läsionen, wie etwa bereits vorhandene Karzinome, aber auch Hyperplasien und epitheliale Atypien im Tuben- [Mingels, 2012] sowie im Ovarialepithel [Kerner, 2005] festgestellt. Als zweite präventive Maßnahme wird die medikamentöse Prophylaxe diskutiert. Orale Kontrazeptiva zeigen generell einen risikosenkenden Effekt auf die Entstehung eines Ovarialkarzinoms [Whittmore, 1992]. Auch bei BRCA-Mutationsträgerinnen wurde nachgewiesen, dass die Einnahme von Kontrazeptiva von mehr als 6 Jahren zu einer Risikoreduktion von bis zu 60 Prozent führt [Moorman, 2013].

1.3.6 Therapeutische Aspekte

BRCA-assoziierte Ovarialkarzinome haben eine höhere Platinsensitivität als sporadisch auftretende. Sie sprechen also besser auf die Platinverbindungen in den Zytostatika an, die in der adjuvanten Chemotherapie angewandt werden [Tan, 2008]. Aus diesem Grund haben Patientinnen mit BRCA-assoziierten Tumoren eine bessere 5-JÜR als Frauen mit sporadisch auftretenden Karzinomen. Bei BRCA1 beträgt sie 44 Prozent, bei BRCA2 52 Prozent. Eine Patientin, bei der der Tumor ohne den Nachweis von BRCA entstanden ist, hat dagegen nur eine 5-JÜR von 36 Prozent [Bolton, 2012].

1.4 Untersuchte Proteine

Im Folgenden soll ein Überblick über die in dieser Arbeit immunhistochemisch untersuchten Proteine gegeben werden.

PAX8

Das Paired-Box 8 (PAX8) -Protein kommt als Transkriptionsfaktor in der embryonalen Entwicklung der Müller-Organe, sowie der Niere und der Schilddrüse vor [Poleev, 1992]. Es ist ein Marker für den Ductus mesonephricus, aus dem sich die Vagina, der Uterus und die Tuben entwickeln [Mackelenbergh, 2015]. Weiterhin steht das Protein in Zusammenhang mit den Tumoren dieser Organe. So wird es in der Karzinogenese reaktiviert und trägt zum Karzinomwachstum sowie der Karzinomentwicklung bei [Elias, 2015].

Das nukleäre PAX8 ist physiologisch in nicht neoplastischem Tubenepithel und in den Inklusionszysten des Ovars zu finden. Außerdem ist es ein sensibler und spezifischer Marker für die Tumoren des Müller-Epithels. Es fällt auf, dass es vor allem in den serösen Tumoren, sowie im Klarzellkarzinom, weniger jedoch in den muzinösen Tumoren gefunden wird [Ozcan, 2011].

PAX2

Paired-Box 2 (PAX2) stammt aus derselben Proteingruppe wie PAX8 und ist ebenfalls ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung von Müller-Organen und anderen urogenitalen Organen spielt [PathologyOutlines-PAX2]. In der Karzinogenese wird er reaktiviert [Patricio, 2013]. PAX2 werden sowohl onkogenetische als auch Tumorsuppressorfunktionen zugesprochen. So trägt es entweder zu einer erhöhten oder zu einer erniedrigten Gewebeproliferation bei [Song, 2013]. Physiologisch kommt das Protein in den Epithelzellen der Tuben und in anderen Müller-Strukturen vor, wie etwa in Endometriosen und Endosalpingiosen [Tong, 2007]. In Tumoren der Müller-Organe wird es unterschiedlich stark exprimiert, insgesamt kommt es aber weniger häufig vor als PAX8 [Oczan, 2011]. Eher selten findet man es in Ovarial- und Endometriumkarzinomen. In Secretary cell outgrowths (SCOUTs) der Tuben treten dagegen häufiger abnormale Expressionsmuster, das heißt eine geringere oder stärkere Expression, auf [Chen, 2010]. PAX2 ist zwar im Vergleich zu PAX8 weniger spezifisch, aber dennoch ein Marker für Müller-Karzinome und deren Metastasen [Wiseman, 2011].

Lef1

Lymphoid enhancer binding factor 1 (Lef1), auch T cell factor (Tcf) genannt, ist ein Transkriptionsfaktor. Er gehört zur High mobility group protein (HMG) -Familie. Diese Proteine regulieren die Genexpression über strukturelle Veränderungen in der DNA-Helix [Travis, 1991]. Lef1/Tcf ist ein Protein des im nachfolgenden Abschnitt beschriebenen Wnt-Signalwegs. Zusammen mit β -Catenin bildet es einen Proteinkomplex im Zellkern und aktiviert so spezifische Zielgene [Hülsken, 2000]. In malignen Ovarialtumoren kommt es deshalb häufig zu einer Expressionskorrelation der beiden Proteine [Rask, 2003]. Es wird mit verschiedenen Tumoren in Verbindung gebracht, da es durch eine Induktion der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) die Tumordinvasion erhöht [Kim, 2002]. In nicht tumorösem Gewebe ist das Protein nicht vorhanden [Huang, 2012].

Eine Überexpression ist häufig assoziiert mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einer serösen Histologie und einer geringeren Überlebensrate [Clements, 2011]. Es ist in vielen drüsenbildenden Adenokarzinomen gynäkologischen, aber auch nicht gynäkologischen Ursprungs, zu finden [Salinas, 2016].

β-Catenin

β-Catenin ist ein Protein, das zwei wichtige Funktionen besitzt. Erstens ist es in die Zell-Zell-Adhäsion involviert und zweitens ist es eine Komponente des Wingless-Integration-1 (Wnt) -Signalwegs. Damit spielt es eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation und des Zelluntergangs [Miron, 1999]. Ist der Wnt-Signalweg nicht aktiviert, liegt β-Catenin in einem Komplex gebunden vor, wird also ständig abgebaut. Sobald Wnt an seinen Rezeptor bindet, wird der Signalweg aktiviert. Der Komplex wird inhibiert, das heißt, β-Catenin wird nicht mehr abgebaut, akkumuliert im Zellplasma und gelangt in den Zellkern. Dort bildet es mit Lef1/Tcf einen Komplex und es werden verschiedene Gene transkribiert [Hülsken, 2000]. β-Catenin kommt in morphologisch unauffälligen Epithelzellen in geringer Dichte im Zytoplasma vor [Barbolina, 2011]. Eine Überexpressionen, das heißt das nukleäre Vorkommen des Proteins, wird mit verschiedenen Karzinomen, darunter auch dem Ovarial- und Endometriumkarzinom, in Zusammenhang gebracht [Miron, 1999]. Der Wnt-Signalweg spielt zwar eine Rolle in der ovariellen Karzinogenese, allerdings sind Mutationen von Signalwegskomponenten in den meisten Ovarialkarzinomen, mit Ausnahme des endometrioiden Subtyps, eher selten [Gatcliffe, 2008]. β-Catenin wird also vor allem mit Tumoren endometrioiden Ursprungs in Verbindung gebracht, seltener mit serösen, muzinösen, seromuzinösen oder Klarzellkarzinomen [Dubeau, 2008].

ARID1A

AT rich interacting domain-containing protein 1A (ARID1A) gehört zur SWI-SNF-Familie und ist in den Chromatin-Umgestaltungskomplex (CUK) involviert. Es steuert also die Zelldifferenzierung und Gewebeentwicklung [Takeda, 2016]. Die Chromatin-Umgestaltung stellt einen molekularen Mechanismus dar, der die Expression verschiedener Gene durch eine Veränderung der Chromatinstruktur reguliert [Clapier, 2009]. Die Gene der SWI-SNF-Familie sind epigenetische Regulatoren, die eine zentrale Rolle in der Transkription und Reparatur der DNA innehaben [Tan, 2013].

Die Expression von ARID1A in stromalem Gewebe wird als physiologisch angesehen [Chene, 2015]. Da die Inaktivierung von Komponenten des CUK mit Malignität in Zusammenhang gebracht wird, wird das Fehlen des Proteins als pathologisch angesehen [Takeda, 2016]. Die Abwesenheit von ARID1A wurde vor allem in Endometriose-assoziierten Ovarialkarzinomen und Endometriumkarzinomen festgestellt [Takeda, 2016]. So wurde bei Klarzellkarzinomen und endometrioiden Karzinomen des Ovars in 47 Prozent beziehungsweise 22 Prozent ein Fehlen des Proteins beobachtet [Chene, 2015], in HGSOCS dagegen wurden keine auffälligen Expressionsmuster gefunden [Wiegand, 2010].

p53

Das Protein p53 ist das zugehörige Genprodukt zu *Tp53* (Tumorprotein 53). Es ist Tumorsuppressorgen, das zur DNA-Reparatur beiträgt. Durch einen Stopp des Zellzyklus stellt es sicher, dass vor einer weiteren Mitose alle DNA-Defekte repariert werden. *TP53*-Mutationen kommen sehr häufig in neoplastischem Gewebe vor. Beim Li-Fraumeni-Syndrom, das bereits in frühem Lebensalter mit multiplen Karzinomen einhergeht, wurde eine Keimbahnmutation des Gens nachgewiesen [PathologyOutlines-p53]. Es wird autosomal-dominant vererbt und bei ungefähr einem Prozent aller hereditären Mammakarzinome diagnostiziert. Das Lebenszeitrisiko für Brustkrebs beträgt bei Mutationsträgerinnen bis zu 90 Prozent [Nichols, 2001]. Eine positive Färbung im Urothel differenziert maligne (In-situ-Karzinome, invasive Karzinome) von reaktiven oder metaplastischen Geschehen, die üblicherweise p53-negativ sind [Mc Kenney, 2001]. Das Protein ist ein Marker für das HGSOCS, da dort zu 93 Prozent *TP53*-Mutationen vorliegen [Karthikeyan, 2016]. Eine starke, diffuse Färbung von mehr als 60 Prozent zeigt eine Missense-Mutation an, eine völlige Abwesenheit der Färbung dagegen eine Nonsense-Mutation [Kurman, 2014]. Bei BRCA-Patientinnen nach einer PBSO lässt sich oft in Zusammenhang mit STICs eine Überexpression des Proteins im Fimbrienepithel der Tuben beobachten [Lee, 2007].

KI67

KI67 ist ein Zellproliferationsmarker. Mit ihm lässt sich der Proliferationsindex bestimmen. Das Protein ist in Geweben vorhanden, die sich in den aktiven Phasen der Zellteilung (G1, S, G2, Mitose), befinden. In ruhenden Zellen ist es nicht zu finden [Scholzen, 2000]. Es wird oft zur Diagnostik von Tumoren eingesetzt, weil dort eine vermehrte Gewebeproliferation stattfindet [Lelle, 1990].

Maligne Neoplasmen sind KI67-positiv, gutartige Neubildungen dagegen eher negativ oder gering positiv. So wurde gezeigt, dass das Vorkommen des Proteins in Ovarialkarzinomen, vor allem der Stadien II und III, signifikant erhöht ist, in Zystadenomen und BOT's dagegen nicht [Garzetti, 1995]. Eine vermehrte Expression wird bei OCs mit einem verkürzten krankheitsfreien Überleben und insgesamt einem schlechteren klinischen Outcome in Verbindung gebracht [Attila, 1998], [Schindlbeck, 2007].

p16

p16 wird durch das Gen p16INK4a, ein Tumorsuppressorgen, kodiert. Das Expressionsmuster kann in heterogen-/fokal-positiv, homogen-/diffus-positiv und negativ eingeteilt werden [Beirne, 2016]. In HGSOCS und auch serösen Karzinomen der Tuben wird das Protein häufig überexprimiert, in den anderen Subtypen der epithelialen ovariellen Tumoren dagegen seltener [Milea, 2011], [O'Neill, 2007]. Die meisten HGSCs (high-grade seröse Karzinome) sind diffus p16-positiv gefärbt, LGSCs (low-grade seröse Karzinome), endometrioide und Klarzellkarzinome dagegen negativ oder nur fokal positiv [Prat, 2014]. Darüberhinaus weißt das Vorhandensein von p16, beispielsweise in Zervixkarzinomen, auf Humane Papillomviren (HPV) hin [Mc Cluggage, 2007].

1.5 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, folgende Fragen zu beantworten:

1. Kommen in Ovarien, die im Rahmen einer PBSO bei BRCA1- oder BRCA2-Mutationsträgerinnen entfernt wurden, gehäuft histomorphologische Veränderungen, wie etwa Inklusionszysten, Follikelzysten oder Endosalpingiosen, vor?
2. Gibt es am ovariellen Oberflächenepithel, in Inklusionszysten oder Endosalpingiosen Vorläuferläsionen von ovariellen Karzinomen, die durch immunhistochemische Färbungen nachgewiesen werden können?
3. Können diesbezüglich Auffälligkeiten im Vergleich zu Patientinnen ohne BRCA-Genmutationen belegt werden?

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Versuchsgruppe

Insgesamt wurden 43 Fälle von 43 Patientinnen, aus dem Archiv des Pathologischen Institutes der Ludwig-Maximilians-Universität München aus den Jahren 2006 bis 2015 retrospektiv untersucht. Das Alter betrug bei Diagnose, das heißt zum Zeitpunkt der PBSO, zwischen 34 und 82 Jahren, im Mittel waren sie 51 Jahre alt. Bei allen Frauen war eine BRCA1- oder BRCA2-Genmutation bekannt. Es wurden ausschließlich Fälle einbezogen, bei denen die Adnexektomie als rein präventive Maßnahme durchgeführt wurde, das heißt noch kein Ovarialkarzinom diagnostiziert worden war. Einige von ihnen befanden sich aber bereits wegen eines Mammakarzinoms in Behandlung. Eine Übersicht über das untersuchte Patientenkollektiv ist in Tab. 4 dargestellt.

Tabelle 4: Übersicht des Versuchskollektivs

Fallnummer	Diagnosealter	BRCA	Mamma-CA
1	52	1	ja
2	34	2	nein
3	42	1	ja
4	46	2	ja
5	45	1	ja
6	54	1	ja
7	51	2	ja
8	63	1	ja
9	52	1	nein
10	62	2	ja
11	49	1	nein
12	62	1	nein
13	44	1	ja
14	42	1	nein
15	58	1	ja

Fallnummer	Diagnosealter	BRCA	Mamma-CA
16	46	1	nein
17	48	1	ja
18	65	1	ja
19	56	2	ja
20	42	1	nein
21	51	1	ja
22	49	2	nein
23	54	1	nein
24	65	1	ja
25	50	1	ja
26	44	1	nein
27	68	2	nein
28	42	2	ja
29	47	2	ja
30	64	2	ja
31	70	2	ja
32	43	2	ja
33	45	1	ja
34	49	2	nein
35	43	1	nein
36	36	2	ja
37	39	1	ja
38	49	1	nein
39	43	2	nein
40	46	2	ja
41	82	2	ja
42	54	1	ja
43	48	2	ja

Das folgende Diagramm zeigt die Altersverteilung der Frauen. Zur besseren Übersicht wurden sie in Altersgruppen von unter 40 Jahren, 40 bis 50 Jahren, 50 bis 60 Jahren, 60 bis 70 Jahren und über 70 Jahren eingeteilt.

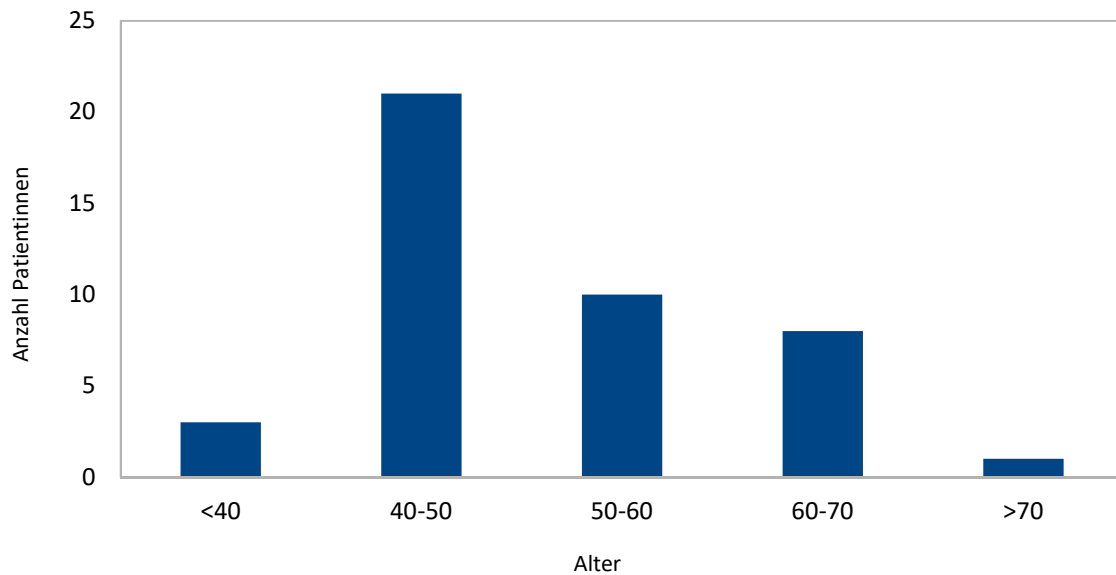


Abbildung 12: Einteilung des Versuchskollektivs in Altersgruppen

Ein Mammakarzinom wurde bei 28 der 43 Fälle diagnostiziert, wie der folgenden Tabelle zu entnehmen ist.

Tabelle 5: Häufigkeit eines Mammakarzinoms

	Häufigkeit	Prozent
Nicht vorhanden	15	34,9
Vorhanden	28	65,1
Gesamt	43	100

Aus der Versuchsgruppe von 43 Patientinnen konnte bei 25 eine BRCA1- und bei 18 eine BRCA2-Genmutation nachgewiesen werden.

Tabelle 6: Häufigkeit der verschiedenen BRCA-Mutationen

	Häufigkeit	Prozent
BRCA1	25	58,1
BRCA2	18	41,9
Gesamt	43	100

Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe wurde aus 20 Fällen des Archivs des Pathologischen Institutes der Ludwig-Maximilians-Universität aus den Jahren 2014 bis 2016 zusammengestellt. Es wurden nur Patientinnen in die Untersuchung eingeschlossen, bei denen klinisch kein Risiko für ein Ovarialkarzinom bekannt war. Bei ihnen erfolgte die Adnexektomie auf Grund einer anderen Diagnose. Das Befundergebnis lautete bei 12 Frauen Endometriumkarzinom, in jeweils 2 Fällen Cervixkarzinom, sowie Zervikale intraepitheliale Neoplasie Grad III (CIN III) und jeweils einmal Hyperplasie des Endometriums, Saktosalpinx, Uterusmyom und Uterusadenom (Tab. 7). Das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose, also der Adnexektomie, betrug zwischen 47 und 79 Jahren. Der Mittelwert lag also bei 61 Jahren. Eine möglichst ähnliche Altersverteilung zur Versuchsgruppe war wichtig, um die Vergleichbarkeit der Gruppen zu gewährleisten.

Tabelle 7: Übersicht des Kontrollkollektivs

Fallnummer	Diagnosealter	Diagnose
1	71	Endometriumkarzinom
2	70	Endometriumkarzinom
3	54	Saktosalpinx
4	76	Uterusmyom
5	69	Cervixkarzinom
6	79	Endometriumkarzinom
7	56	Endometriumkarzinom
8	47	Cervixkarzinom
9	74	CIN III
10	48	Endometriumkarzinom
11	53	Hyperplasie mit Atypie des Endometriums
12	69	Endometriumkarzinom
13	70	Endometriumkarzinom
14	63	Plattenepithelkarzinom der Cervix uteri
15	54	Endometriumkarzinom
16	57	Endometriumkarzinom
17	47	Endometriumkarzinom
18	57	Adenom des Uterus
19	59	CIN III
20	51	Endometriumkarzinom

Die Altersverteilung der Kontrollgruppe ist dem nächsten Diagramm zu entnehmen. Zur besseren Übersicht wurden die Patientinnen in die Altersgruppen unter 60 Jahre, 60 bis 70 Jahre und über 70 Jahre eingeteilt.

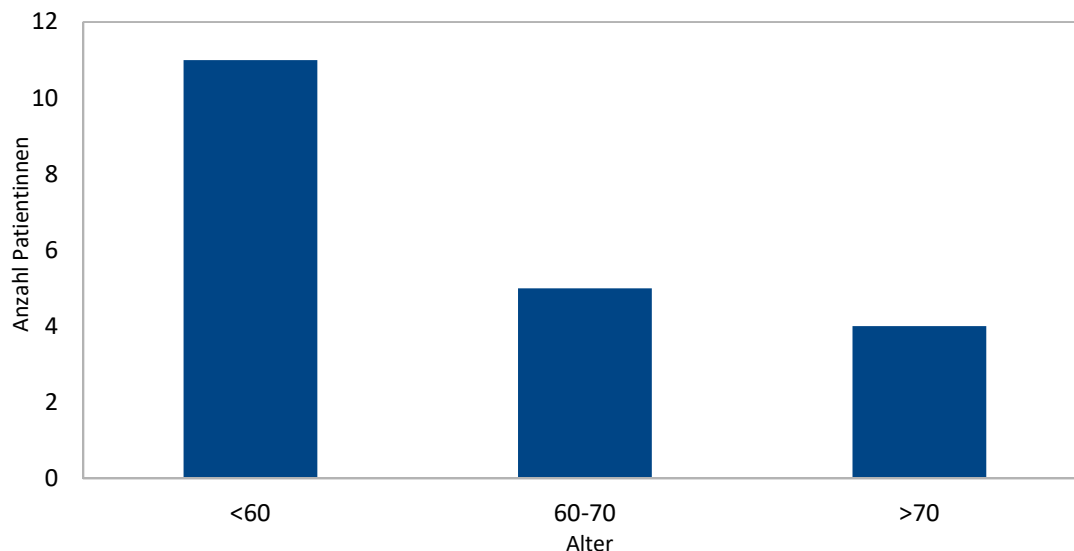


Abbildung 13: Einteilung des Kontrollkollektivs in Altersgruppen

Patientenauswahl und Anfertigung histologischer Schnitte

Am Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München wurden mit der Computersoftware PathoPro der Firma ifms die für die Untersuchung in Frage kommenden Patientinnen ausgewählt und die den Fällen zugehörigen, in Paraffinblöcke eingebetteten Gewebeproben aus dem Archiv zusammengestellt. Die Patientinnen wurden voll anonymisiert. Zu jeder Patientin wurden, soweit vorhanden, jeweils das rechte und linke Ovar untersucht. Insgesamt waren für die Versuchsgruppe 76 und für die Kontrollgruppe 39 Gewebeproben vorhanden. Von diesen wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms neun Leerschnitte pro Ovar angefertigt. Es wurde jeweils ein Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbter Schnitt zur Übersicht über die histomorphologische Beschaffenheit des ovarialen Gewebes hergestellt. Weiter wurden acht immunhistochemische Färbungen mit den Antikörpern PAX8, PAX2, Lef1, β -Catenin, ARID1A, p53, KI67 und p16 für die mikroskopische Auswertung vorbereitet.

2.3 Untersuchungsmaterialien

Nachfolgend werden die verwendeten Verbrauchsmaterialien, die benötigten Geräte, die verwendeten Chemikalien und die Antikörper für die jeweiligen immunhistochemischen Färbungen aufgeführt.

2.3.1 Verbrauchsmaterialien

Objektträger:	Menzel-Gläser Super Frost/Plus, Menzel GmbH&Co.KG, Braunschweig, Deutschland
Deckfolien:	Tissue-Tek Coverslipping Film, Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Eindeckgelatine:	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Deckgläser:	Menzel-Gläser, Menzel GmbH&Co.KG, Braunschweig, Deutschland
Pipettenspitzen:	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.3.2 Geräte

Mikrotom:	Rotationsmikrotom, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Wasserbad:	Typ 3047, Kottermann GmbH, Uetze/Haningsen, Deutschland
Mikrowelle:	Miele&Cie.KG, Gütersloh, Deutschland
Waage:	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Brutschrank:	Memmert GmbH&Co.KG, Schwabach, Deutschland
pH-Meter:	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipetten:	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Glasküvetten:	aus dem Bestand des Pathologischen Instituts
Lichtmikroskop:	Laborlux, Leitz, Wetzlar, Deutschland

2.3.3 Chemikalien

Paraffin:	Histosec Pastillen ohne Dimethylsulfoxid, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aqua dest.:	Firma Noll, München, Deutschland
Xylol:	Häffner GmbH&Co.KG, Asperg, Deutschland
Ethanol:	Staub&Co.-SilbermannGmbH, München, Deutschland
Hämalaun:	Waldeck GmbH&Co.KG, Münster, Deutschland
Eosin alk.:	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ProTaq _s VI Antigen Enhancer:	Quartett GmbH, Berlin, Deutschland
ImmPRESS Reagent Kit	
Anti-RABBIT Ig:	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Vectastain ABC-Kit	
Elite Universal:	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
AEC Substrate-Chromogen:	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Hematoxylin Gill's Formula:	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Target Retrieval Solution:	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
DAB ₊ :	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Färbemodule:	Ventana BenchMark XT IHC/ISH, Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz
0,05M Tris-Puffer, eingestellt auf pH 7,5:	34,25 g Trizma hydrochlorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA 43,90 g Sodium Chloride, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland 4,50 g Trizma base, Sigma-Adlrich, St. Louis, USA 5 L Aqua dest., Firma Noll, München, Deutschland

2.3.4 Antikörper

Manuell durchgeführte Färbungen

Färbung	Detektionssystem	Primär-AK	AK-Spezies	Klon	Subtyp	Hersteller AK
PAX2:	ImmPRESS Reagent Kit Anti-RABBIT Ig (Fa.Vector)	PAX2	Mono-clonal Rabbit	EPR 8586	IgG	Fa.Abcam
Lef1:	Vectastain ABC-Kit Elite Universal (Fa.Vector)	Lef1	Rabbit		IgG	Fa.Cell Signaling
ARID1A:	Vectastain ABC-Kit Elite Universal (Fa.Vector)	ARID1A	Mono-clonal Rabbit	EPR 1350 1-73		Fa.Abcam

Vollautomatisch durchgeführte Färbungen

Färbung	Prozedur	Färbemodul	AK-Spezies	Klon	Subtyp	Hersteller AK
PAX8	XT ultraView DAB v3	BenchMark XT IHC/ISH (Ventana)	Monoclonal Mouse	MRQ-50		Cell Marque
β-Catenin	XT ultraView DAB v3	BenchMark XT IHC/ISH (Ventana)	Monoclonal Mouse	14	IgG1	Ventana Medical Systems, Inc.
p53	XT ultraView DAB v3	BenchMark XT IHC/ISH (Ventana)	Mouse	DO-7	IgG2b kappa	Thermo Scientific™ Lab Vision™

Färbung	Prozedur	Färbemodul	AK-Spezies	Klon	Subtyp	Hersteller AK
KI67	XT ultraView DAB v3	BenchMark XT IHC/ISH (Ventana)	Monoclonal Mouse	MIB-1	IgG1 kappa	
p16	XT ultraView DAB v3	BenchMark XT IHC/ISH (Ventana)	Monoclonal Mouse			Ventana Medical Systems, Inc.

2.4 Grundlagen der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, mit dem Antigene, also Proteine, im Gewebe mit Hilfe von spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Dazu wird das histologische Material in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach Anfertigung dünner Gewebeschnitte wird, um Eiweißvernetzungen, die durch die Formalinfixierung entstanden sind, wieder aufzubrechen, entweder eine enzymatische Behandlung (zum Beispiel mit Trypsin oder Proteinase K) oder eine Probenvorbereitung in der Mikrowelle beziehungsweise im Autoklaven durchgeführt [Lang, 2013]. Insgesamt können drei verschiedene Färbeverfahren zum Einsatz kommen. Bei der am wenigsten sensitiven direkten Methode wird ein mit einem Marker konjugierter Primär-Antikörper eingesetzt, welcher an das Antigen bindet. Er ist also direkt mit dem Enzym beziehungsweise dem Farbstoff gekoppelt. Für die etwas sensitivere Zwei-Schritt-indirekte Methode wird zunächst ein unmarkierter Primär-Antikörper verwendet, der an das Antigen im Gewebe bindet und danach einen zusätzlichen Sekundär-Antikörper, also einem Enzym beziehungsweise Farbstoff, der wiederum mit dem Primär-Antikörper interagiert. Hier erfolgt die Färbung erst im zweiten Schritt. Die dritte Methode ist die Drei-Schritt-indirekte Methode und nutzt drei Antikörper, wobei der zweite als Brücken-Antikörper zwischen dem ersten und dem dritten dient. Zur Drei-Schritt-indirekten Methode zählen die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Komplex, die Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)- und die Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Methode.

Die Drei-Schritt-indirekte Methode ist die sensitivste und deswegen auch die am häufigsten angewandte Technik [Noll, 2000]. Anwendungsbereiche der Immunhistochemie sind unter anderem die Klassifizierung und Bestimmung von prognostischen Faktoren bei Tumorerkrankungen, die selektive Darstellung bestimmter Zelltypen und der Nachweis beziehungsweise die Identifizierung von Proteinen in Geweben [Lang, 2013].

2.5 Methode

Im folgenden Kapitel wird der Ablauf der histologischen Materialaufbereitung sowie der immunhistochemischen Färbungen beschrieben.

2.5.1 Aufarbeitung der Gewebeproben

Das Gewebe wurde zuerst in einer Formalinlösung fixiert, welche später mit Hilfe von destilliertem Wasser wieder ausgewaschen wurde. Danach wurden die Präparate mit einer in der Konzentration aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Abschließend wurden sie in heißes Paraffin eingebracht und in Blöcke gegossen werden.

2.5.2 Schneiden der Gewebeproben

Die in Paraffinblöcke eingebetteten Gewebe wurden zunächst auf -20°C abgekühlt. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden sie in Form von zwei bis drei Mikrometer dicken Schnitten gebracht. Diese wurden zuerst in einem Kaltwasserbad (20°C) aufgefangen und anschließend in einem Heißwasserbad (45°C) gestreckt. Danach wurden sie auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 40°C getrocknet.

2.5.3 Entparaffinierung

Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte zweimal für jeweils 15 Minuten in Xylol gelagert. Dieses wurde danach zweimal für jeweils zehn Minuten in Ethanol wieder ausgewaschen.

2.5.4 Vorbehandlung

Zum Aufbrechen formalininduzierter Proteinvernetzungen wurden die Schnitte in einer Küvette mit Target Retrieval Solution bei 750 Watt für zweimal 15 Minuten in der Mikrowelle gekocht. Danach wurden sie 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend zweimal für fünf Minuten mit Tris-Puffer-Lösung gespült.

2.5.5 Blockade der endogenen Peroxidasen

Als nächstes wurden die endogenen Peroxidasen des Gewebes durch zehnminütige Lagerung in 7,5%iger Wasserstoffperoxid-Lösung blockiert und danach für die gleiche Zeit unter fließendem Wasser gespült. Daraufhin wurde es zweimal für fünf Minuten mit der Tris-Puffer-Lösung behandelt und schließlich für 20 Minuten das Blocking Serum aus dem jeweiligen Färbe-Kit aufgetragen.

2.5.6 Immunhistochemische Färbungen

Die PAX2-, Lef1- und ARID1A-Färbungen erfolgten von Hand, die restlichen Färbungen (PAX8, β -Catenin, p53, KI67 und p16) wurden vollautomatisch durchgeführt.

Auf die von Hand zu färbenden Schnitte wurde zunächst der jeweilige Primär-Antikörper für 60 Minuten aufgetragen. Danach wurde zweimal für fünf Minuten mit der Tris-Puffer-Lösung gespült. Daraufhin wurde der zugehörige Sekundär-Antikörper für 30 Minuten appliziert und anschließend wieder mit Tris-Puffer-Lösung gewaschen. Nun wurde das Chromogen für zehn Minuten aufgebracht, mit Wasser abgespült, hiernach für zehn Sekunden mit Hematoxylin gegengefärbt und eine zehnminütige Wässerung angeschlossen.

Abschließend wurden die Präparate mit Eindeckgelatine und einem Deckglas versehen.

2.6 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit einem Lichtmikroskop. Von jedem Ovar waren insgesamt neun Schnitte vorhanden, jeweils eine HE- sowie acht immunhistochemische Färbungen (PAX8, PAX2, Lef1, β -Catenin, ARID1A, p53, KI67 und p16). Diese wurden pro Fall jeweils nacheinander untersucht. Die HE-Färbungen verhalfen zu einer Übersicht über das jeweilige Gewebe und seinen histomorphologischen Veränderungen. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Läsionen im Oberflächenepithel der Ovarien, Inklusions- und Follikelzysten sowie Endosalpingiosen gelegt. Diese morphologischen Auffälligkeiten wurden weiter auf Abweichungen in den immunhistochemischen Färbemustern untersucht. PAX8, PAX2, Lef1, ARID1A und KI67 wurden als „positiv“ bezeichnet, wenn eine Genexpression ubiquitär oder fokal mit mindestens drei positiv gefärbten Zellen nebeneinander vorhanden war, als „negativ“, wenn eine solche gefehlt hat.

Für p53 und p16 wurden die Begriffe „regulär“ beim Vorhandensein einzelner angefärbter Zellen und „positiv“ bei einer positiven Färbung von mehr als zehn Zellen (p53) beziehungsweise mehr als drei Zellen (p16) nebeneinander verwendet. β -Catenin wurde entsprechend seiner Lokalisation in „zytoplasmatisch“ und „nukleär“ eingeteilt.

2.7 Statistische Auswertung

Die fortlaufende Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Microsoft Office Excel 2010, die statistische Auswertung mit dem Programm IBM SPSS Statistics Version 23. Die mikroskopisch erhobenen und in Excel dokumentierten Daten wurden zu Fällen zusammengefasst und für SPSS formatiert. Mit dem Statistikprogramm wurden die jeweiligen Häufigkeiten der histomorphologischen Veränderungen berechnet. Weiterhin wurde ausgewertet, wie hoch die Genexpression in den morphologisch auffälligen Strukturen war. Dieselben Untersuchungen wurden bei der Kontrollgruppe angestellt. Der Vergleich der Ergebnisse zwischen den beiden Kollektive erfolgte mit Hilfe des Exakten Tests nach Fisher. Um einen Unterschied als signifikant ansehen zu können, musste der p-Wert $<0,05$ sein. Zur grafischen Darstellung der Ergebnisse wurden prozentual gestapelte Balkendiagramme verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Versuchsgruppe

3.1.1 Auswertbarkeit der Untersuchungen

Die Versuchsgruppe (im Folgenden auch BRCA-Gruppe genannt) bestand aus 43 Fällen. Die folgenden Kapitel beziehen sich ausschließlich auf das Patientenkollektiv der Versuchsgruppe.

3.1.2 Histomorphologische Veränderungen

Die histomorphologischen Veränderungen wurden in der HE-Färbung untersucht. Dabei wurden in 29 von 43 Fällen (67 %) Inklusionszysten festgestellt und in 14 Fällen (33 %) Endosalpingiosen. In 15 Fällen (35 %) waren Follikelzysten vorhanden. Die folgenden Tabellen zeigen jeweils die Häufigkeiten der Inklusionszysten, Endosalpingiosen und Follikelzysten. Ansonsten waren die Ovarien unauffällig.

Tabelle 8: Häufigkeit von Inklusionszysten in der HE-Färbung, BRCA-Gruppe

	Häufigkeit	Prozent
Nicht vorhanden	14	32,6
Vorhanden	29	67,4
Gesamt	43	100,0

Tabelle 9: Häufigkeit von Endosalpingiosen in der HE-Färbung, BRCA-Gruppe

	Häufigkeit	Prozent
Nicht vorhanden	29	67,4
Vorhanden	14	32,6
Gesamt	43	100,0

Tabelle 10: Häufigkeit von Follikelzysten in der HE-Färbung, BRCA-Gruppe

	Häufigkeit	Prozent
Nicht vorhanden	28	65,1
Vorhanden	15	34,9
Gesamt	43	100,0

3.1.3 PAX8

33 der 43 Fälle (77 %) zeigten fokale am Oberflächenepithel eine PAX8-Expression (Tab.11). Von den Inklusionszysten waren 27 (93 %) positiv gefärbt (Tab. 12), von den Endosalpingiosen 13 (93 %), siehe Tab. 13.

Tabelle 11: PAX8-Expression im Oberflächenepithel, BRCA-Gruppe

	Häufigkeit	Prozent
Negativ	10	23,3
Positiv	33	76,7
Gesamt	43	100,0

Tabelle 12: PAX8-Expression in den Inklusionszysten, BRCA-Gruppe

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Gültig	negativ	2	4,7	6,9
	positiv	27	62,8	93,1
	Gesamt	29	67,4	100,0
Fehlend	System	14	32,6	
Gesamt		43	100,0	

Tabelle 13: PAX8-Expression in den Endosalpingiosen, BRCA-Gruppe

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Gültig	negativ	1	2,3	7,1
	positiv	13	30,2	92,9
	Gesamt	14	32,6	100,0
Fehlend	System	29	67,4	
Gesamt		43	100,0	

Die folgenden Abbildungen zeigen fokal PAX8-positives Oberflächenepithel, sowie eine Inklusionszyste und eine Endosalpingiose, die PAX8 exprimieren.

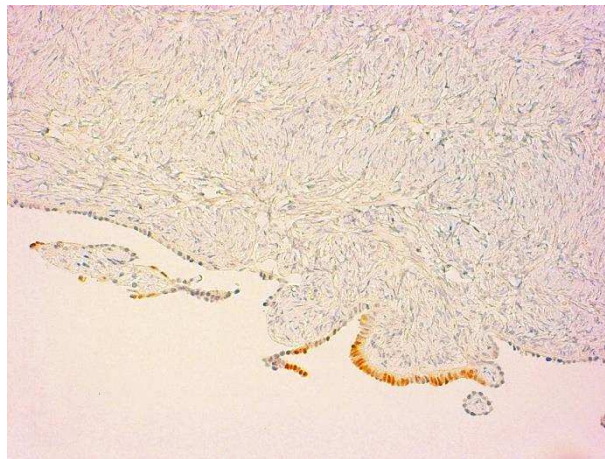


Abbildung 14: Papillomatös verändertes Oberflächenepithel, fokal PAX8-positiv gefärbt, 200-fach vergrößert

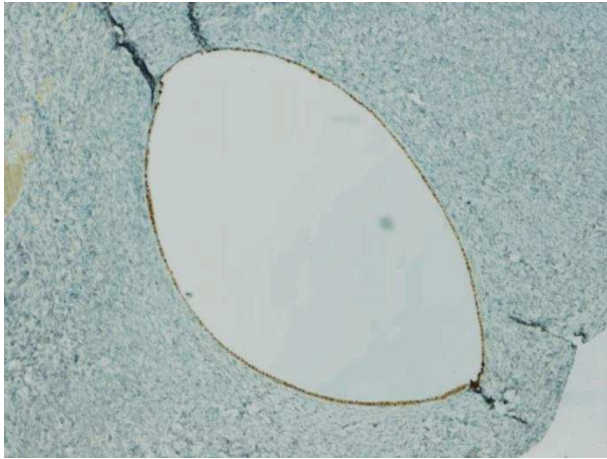


Abbildung 15: PAX8-positiv gefärbte Inklusionszyste, 100-fach vergrößert

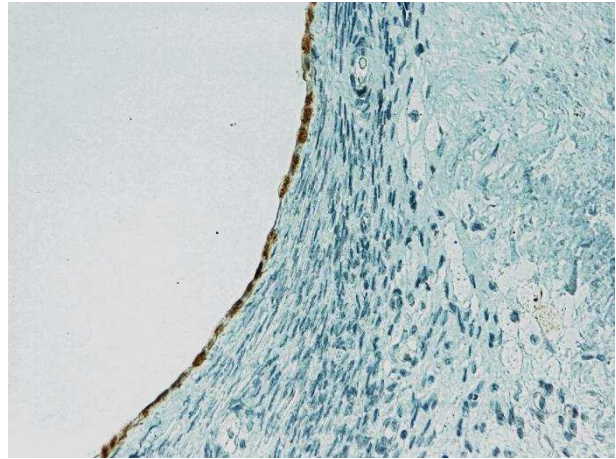


Abbildung 16: PAX8-positiv gefärbte Inklusionszyste, 400-fach vergrößert

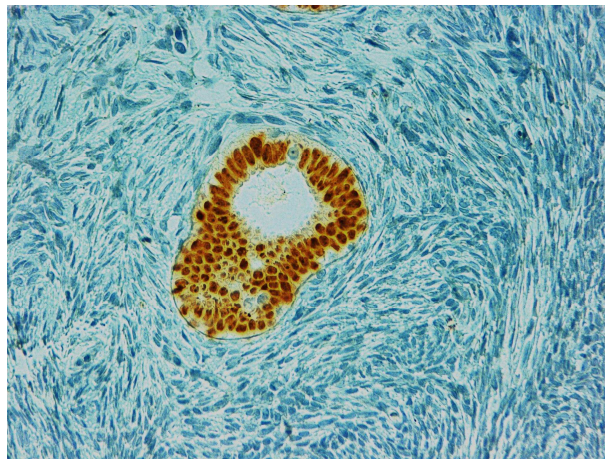


Abbildung 17: PAX8-positiv gefärbte Endosalpingiose, 400-fach vergrößert

3.1.4 PAX2

In 9 Fällen (21 %) zeigte das Oberflächenepithel fokal eine nukleäre PAX2-Expression. Von den Inklusionszysten waren 21 (72 %) und von den Endosalpingiosen 11 (73 %) PAX2-positiv; die Ergebnisse siehe Tab.14 -16 und Abb. 18 -20.

Tabelle 14: PAX2-Expression im Oberflächenepithel, BRCA-Gruppe

	Häufigkeit	Prozent
Negativ	34	79,1
Positiv	9	20,9
Gesamt	43	100,0

Tabelle 15: PAX2-Expression in den Inklusionszysten, BRCA-Gruppe

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Gültig	negativ	8	18,6	27,6
	positiv	21	48,8	72,4
	Gesamt	29	67,4	100,0
Fehlend	System	14	32,6	
Gesamt		43	100,0	

Tabelle 16: PAX2-Expression in den Endosalpingiosen, BRCA-Gruppe

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Gültig	negativ	4	9,3	26,7
	positiv	11	25,6	73,3
	Gesamt	15	34,9	100,0
Fehlend	System	28	65,1	
Gesamt		43	100,0	

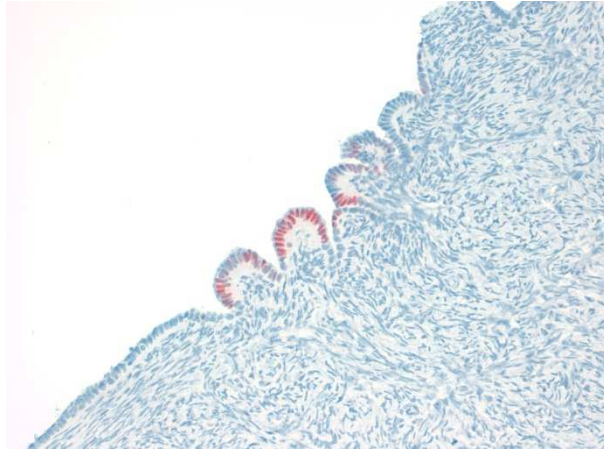


Abbildung 18: Papillomatös verändertes Oberflächenepithel, PAX2-positiv gefärbt, 200-fach vergrößert

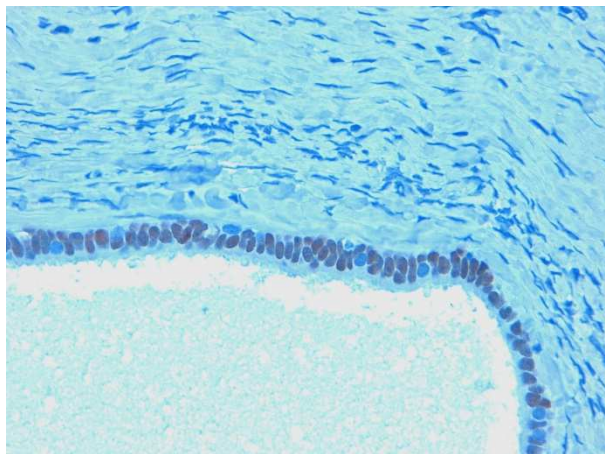


Abbildung 19: PAX2 positiv gefärbte Inklusionszyste, 400-fach vergrößert

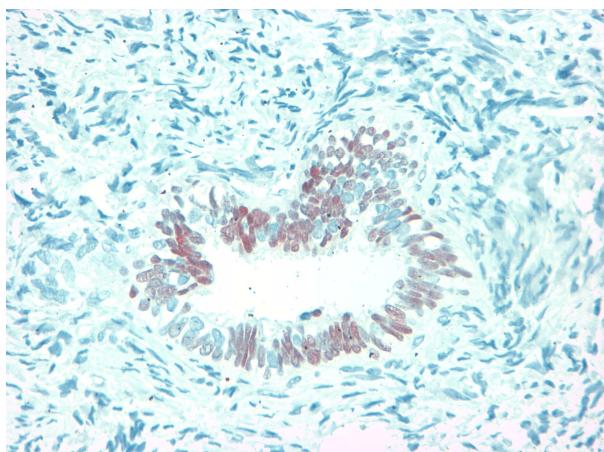


Abbildung 20: PAX2-positiv gefärbte Endosalpingiose, 400-fach vergrößert

3.1.5 Lef1

Lef1 war in 41 der 43 Fälle (95 %) fokal im Oberflächenepithel exprimiert und in 8 Inklusionszysten (27 %). Insgesamt 3 Endosalpingiosen (21 %) waren Lef1-positiv (Tab. 17-19; Abb. 21-24).

Tabelle 17: Lef1-Expression im Oberflächenepithel, BRCA-Gruppe

	Häufigkeit	Prozent
Negativ	2	4,7
Positiv	41	95,3
Gesamt	43	100,0

Tabelle 18: Inklusionszysten in der Lef1-Färbung, BRCA-Gruppe

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Gültig	negativ	22	51,2	73,3
	positiv	8	18,6	26,7
	Gesamt	30	69,8	100,0
Fehlend	System	13	30,2	
Gesamt		43	100,0	

Tabelle 19: Lef1-Expression in den Endosalpingiosen, BRCA-Gruppe

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Gültig	negativ	11	25,6	78,6
	positiv	3	7,0	21,4
	Gesamt	14	32,6	100,0
Fehlend	System	29	67,4	
Gesamt		43	100,0	

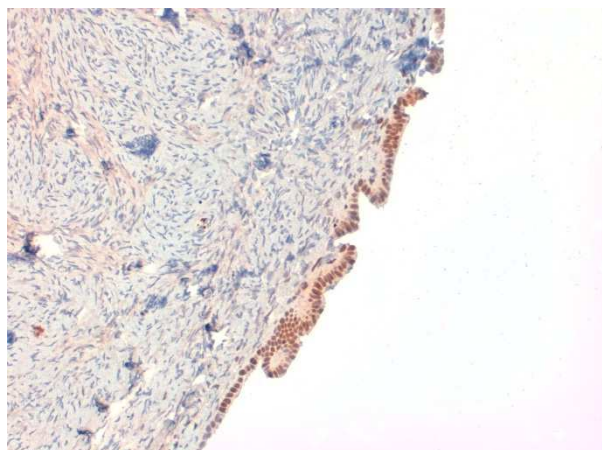
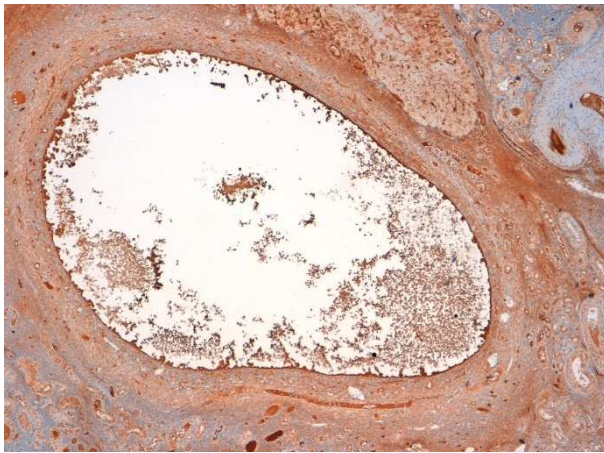
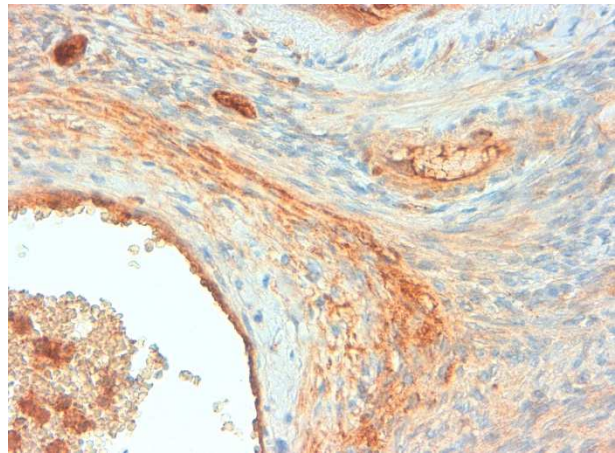


Abbildung 21: Oberflächenepithel, fokal Lef1-positiv gefärbt, 200-fach vergrößert



*Abbildung 22: Lef1-positive
Inklusionszyste, 40-fach vergrößert*



*Abbildung 23: Ausschnitt aus einer Lef1-
positiv gefärbten Inklusionszyste, 400-
fach vergrößert*



Abbildung 24: Lef1-positiv gefärbte Endosalpingiose, 400-fach vergrößert

3.1.6 β -Catenin

β -Catenin zeigte keine pathologische Expression. Es lag im Oberflächenepithel, sowie in den Inklusionszysten und auch in den Endosalpingiosen nur zytoplasmatisch vor. Nukleär war es in keinem der Fälle vorhanden.

3.1.7 ARID1A

ARID1A wurde in allen drei untersuchten histomorphologischen Ausprägungen exprimiert. Die Bilder zeigen das physiologische Vorkommen des Proteins [Chene, 2015].

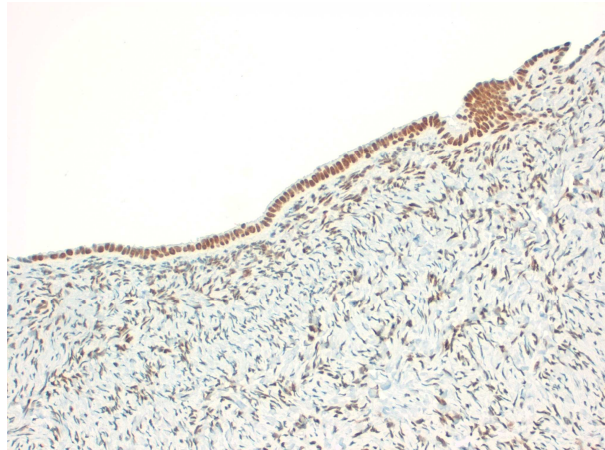


Abbildung 25: ARID1A-positiv gefärbtes Oberflächenepithel, 200-fach vergrößert

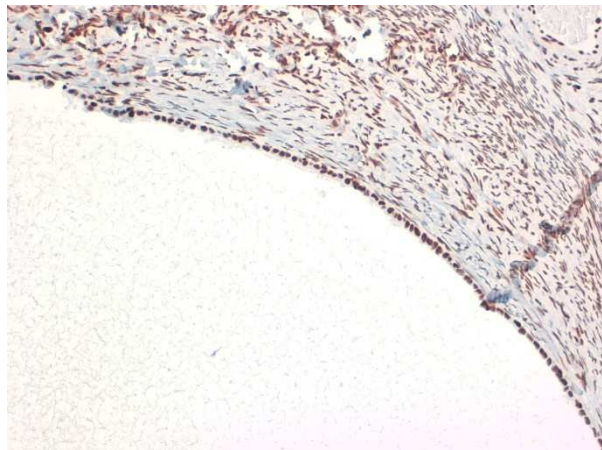


Abbildung 26: Ausschnitt aus einer ARID1A-positiv gefärbten Inklusionszyste, 200-fach vergrößert

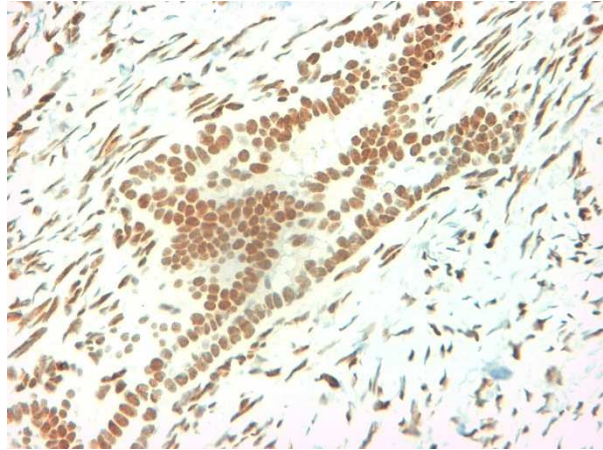


Abbildung 27: ARID1A-positiv gefärbte Endosalpingiose, 400-fach vergrößert

3.1.8 p53

In keinem der 43 Fälle war eine erhöhte Expression des Proteins *Tp53* nachzuweisen, weder im Oberflächenepithel, noch in den Inklusionszysten und in den Endosalpingiosen.

3.1.9 KI67

Der Proliferationsmarker KI67 war weder im Oberflächenepithel, noch in den Inklusionszysten und den Endosalpingiosen zu finden.

3.1.10 p16

p16 trat im Oberflächenepithel in 16 Fällen (37 %) auf, bei den Inklusionszysten in 8 Fällen (27 %) und bei den Endosalpingiosen in 4 Fällen (29 %). Die Ergebnisse sind in den Tab. 20-22 und in den Abb. 28-30 dargestellt.

Tabelle 20: p16-Expression im Oberflächenepithel, BRCA-Gruppe

	Häufigkeit	Prozent
Positiv	16	37,2
Regulär	27	62,8
Gesamt	43	100,0

Tabelle 21: Tabelle 26: p16-Expression in den Inklusionszysten, BRCA-Gruppe

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Gültig	positiv	8	51,2	26,7
	regulär	22	18,6	73,3
	Gesamt	30	69,8	100,0
Fehlend	System	13	30,2	
Gesamt		43	100,0	

Tabelle 22: p16-Expression in den Endosalpingiosen, BRCA-Gruppe

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Gültig	Positiv	4	9,3	28,6
	regulär	10	23,3	71,4
	Gesamt	14	32,6	100,0
Fehlend	System	29	67,4	
Gesamt		43	100,0	

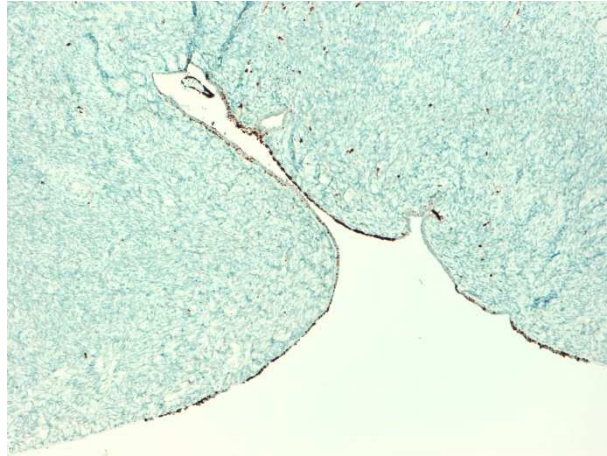


Abbildung 28: Einstülpung im Oberflächenepithel, fokal p16-positiv gefärbt, 100-fach vergrößert



Abbildung 29: p16-positiv gefärbte Inklusionszyste, 100-fach vergrößert



Abbildung 30: p16-positiv gefärbte Endosalpingiose, 200-fach vergrößert

3.11 Vergleich mit der Kontrollgruppe

Die in der Versuchsgruppe beschriebenen Ergebnisse wurden mit einer Kontrollgruppe, die aus 20 Patientinnen ohne BRCA-Genmutation bestand, verglichen. Zur Veranschaulichung wurden die Resultate der beiden Kollektive in prozentual gestapelten Balkendiagrammen dargestellt. Die Häufigkeiten wurden in einen relativ-prozentualen Bezug zueinander gesetzt.

Im Bereich der histomorphologischen Veränderungen konnten folgende Beobachtungen gemacht werden: In 11 Fällen (55 %) kamen Inklusionszysten vor, in 5 Fällen (25 %) Endosalpingiosen und in 4 Fällen (20 %) Follikelzysten. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe gefunden, siehe Abb. 31-33. In den folgenden Diagrammen werden diese Ergebnisse im prozentualen Vergleich gezeigt.

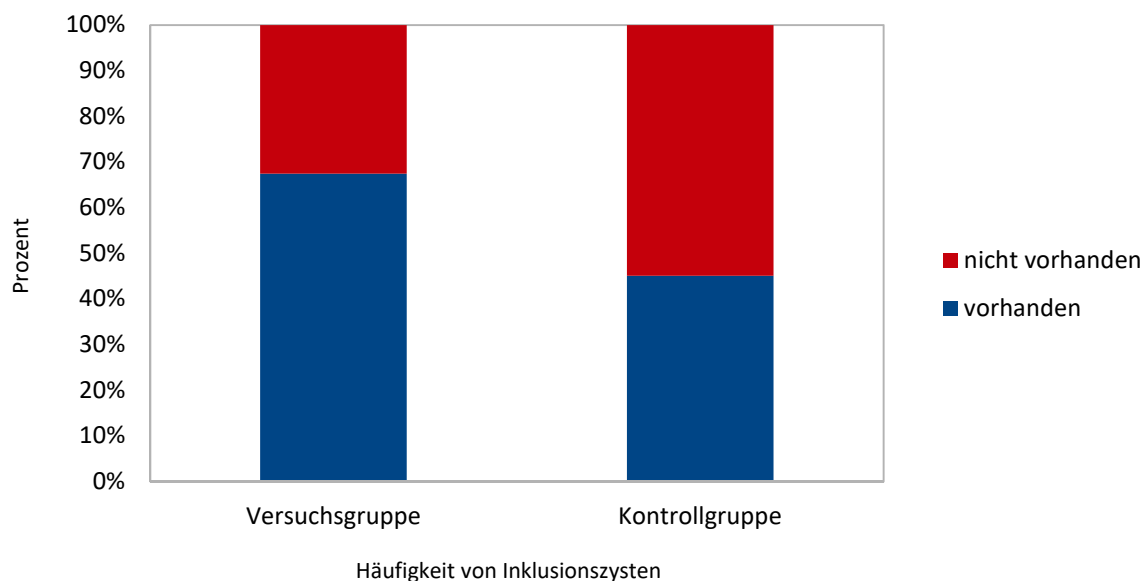


Abbildung 31: Prozentuale Häufigkeit von Inklusionszysten in der HE-Färbung, Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe

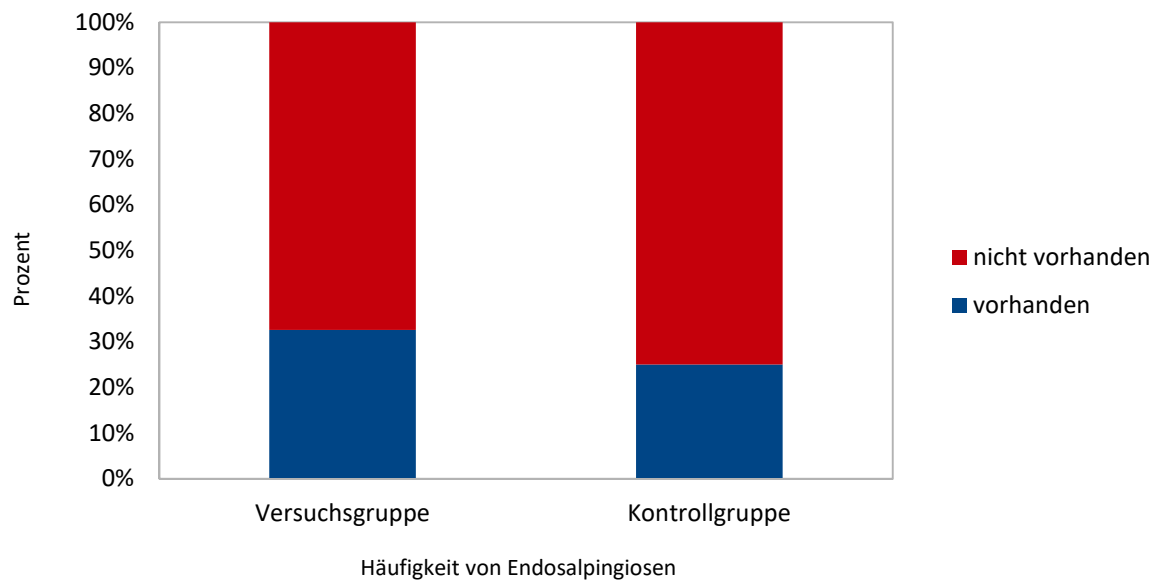


Abbildung 32: Prozentuale Häufigkeit von Endosalpingiosen in der HE-Färbung, Vergleich Versuchs-und Kontrollgruppe

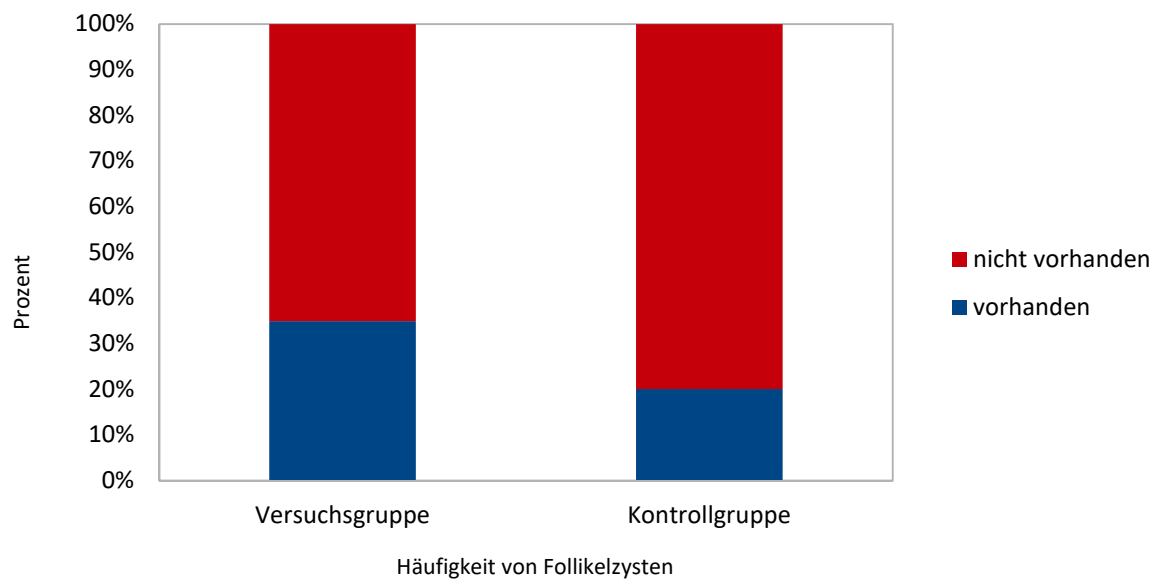


Abbildung 33: Prozentuale Häufigkeit von Follikelzysten in der HE-Färbung, Vergleich Versuchs-und Kontrollgruppe

In der PAX8-Färbung war das Oberflächenepithel bei 7 von 20 Patientinnen (35 %) positiv. Die Inklusionszysten und die Endosalpingiosen zeigten zu 100 % eine Proteinexpression. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Versuchsgruppe war nur im Fall des Oberflächenepithels zu verzeichnen. Der Exakte Test nach Fisher zeigte einen p-Wert von 0,002, war also unter dem festgesetzten p-Wert von 0,05. Die untenstehende Tabelle sowie die Balkendiagramme veranschaulichen dieses Ergebnis. Außerdem ist ein PAX8-positiver Bereich im Oberflächenepithel eines Ovars aus der Versuchsgruppe im Vergleich zu einem PAX8-negativem Bereich aus der Kontrollgruppe dargestellt.

Tabelle 23: PAX8-Expression im Oberflächenepithel, Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe, Exakter Test nach Fisher

	negativ	positiv	Gesamt	Exakte Signifikanz (2-seitig)
BRCA-Gruppe	10	33	43	
Kontrollgruppe	13	7	20	
Gesamt	23	40	63	
Exakter Test nach Fisher				0,002

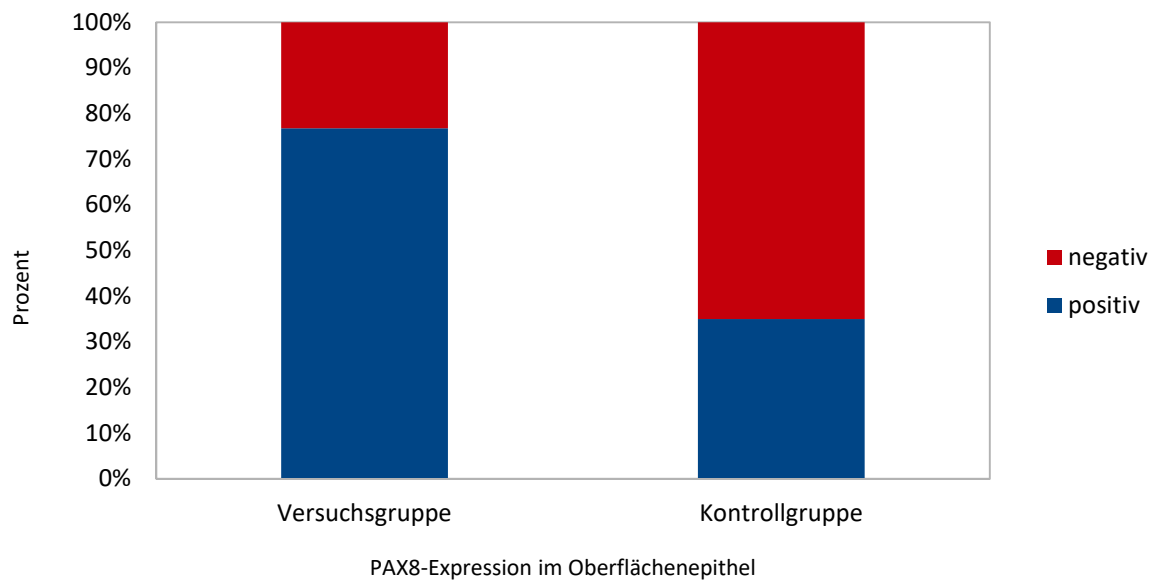


Abbildung 34: Prozentuale PAX8-Expression im Oberflächenepithel, Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe

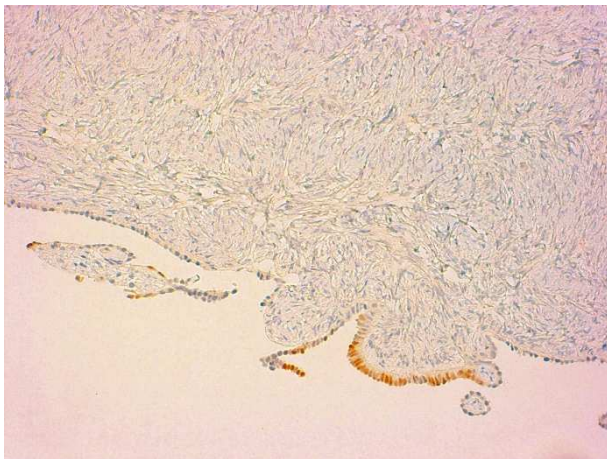


Abbildung 35: PAX8-positiv gefärbtes Oberflächenepithel, Versuchsgruppe, 200-fach vergrößert

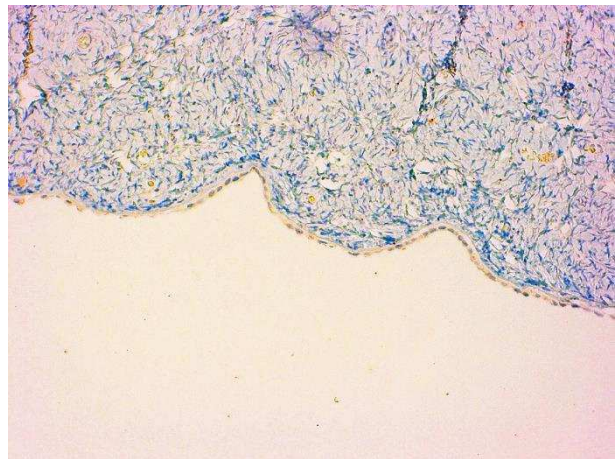


Abbildung 36: PAX8-negativ gefärbtes Oberflächenepithel, Kontrollgruppe, 200-fach vergrößert

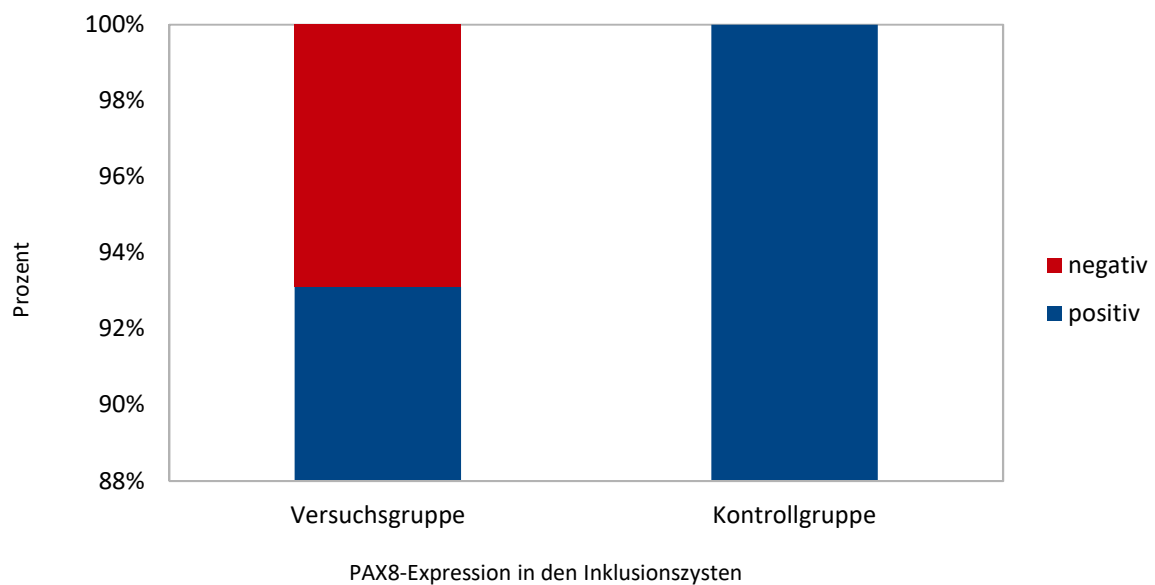


Abbildung 37: Prozentuale PAX8-Expression in den Inklusionszysten, Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe

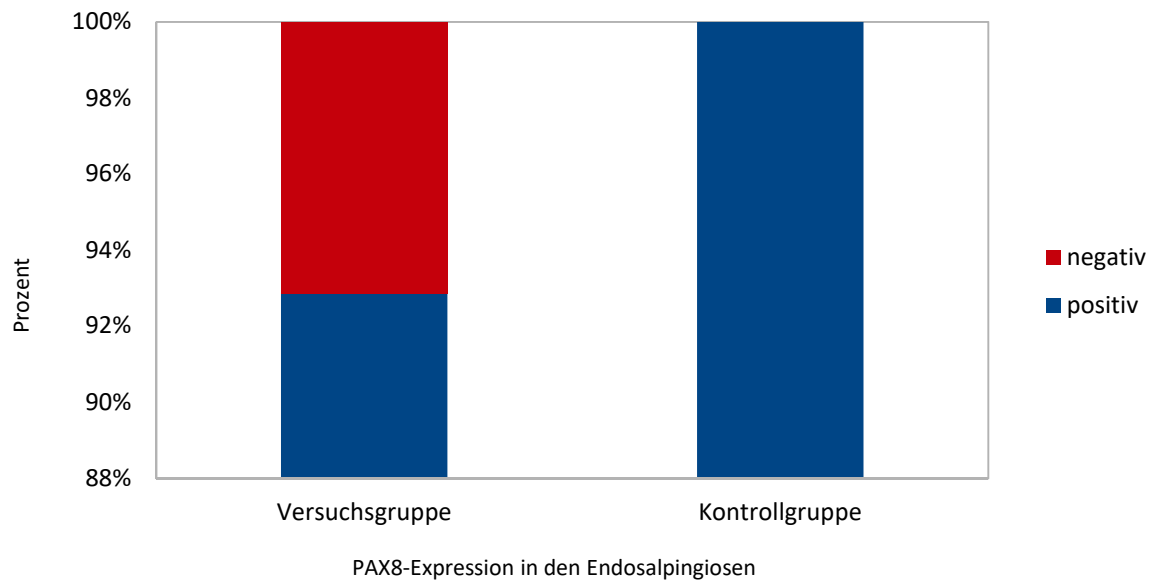


Abbildung 38: PAX8-Expression in den Endosalpingiosen, Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe

PAX2 wurde bei der Kontrollgruppe im Oberflächenepithel in 1 Fall (5 %), in allen 11 Inklusionszysten (100 %) und in 3 von 5 Endosalpingiosen (60 %) beobachtet. Es waren keine statistisch signifikanten Unterschiede nachzuweisen. Das zeigen folgende Diagramme.

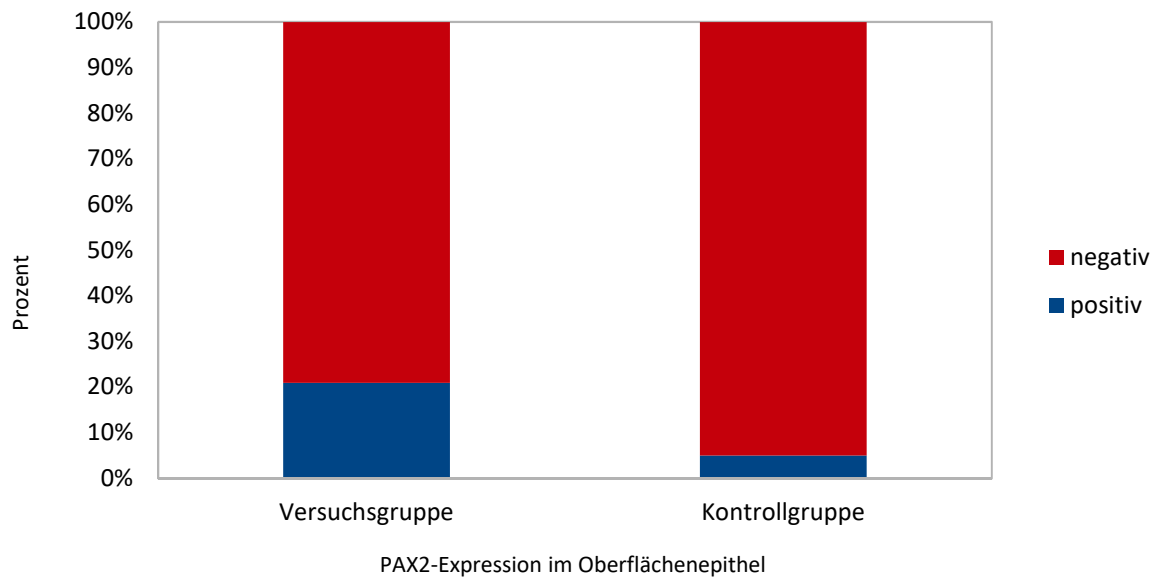


Abbildung 39: Prozentuale PAX2-Expression im Oberflächenepithel, Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe

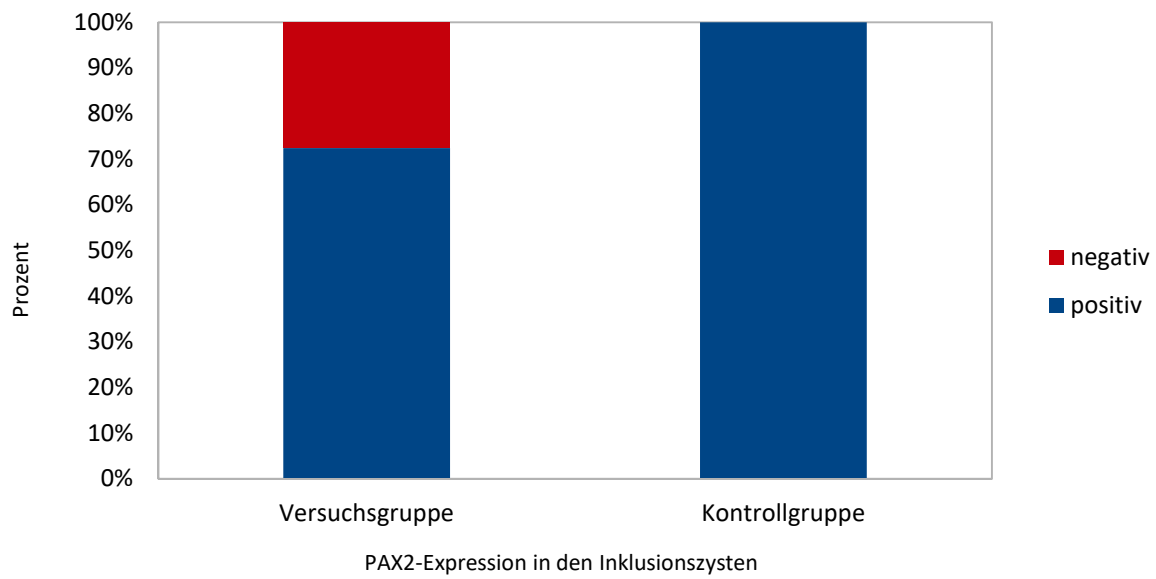


Abbildung 40: Prozentuale PAX2-Expression in den Inklusionszysten, Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe

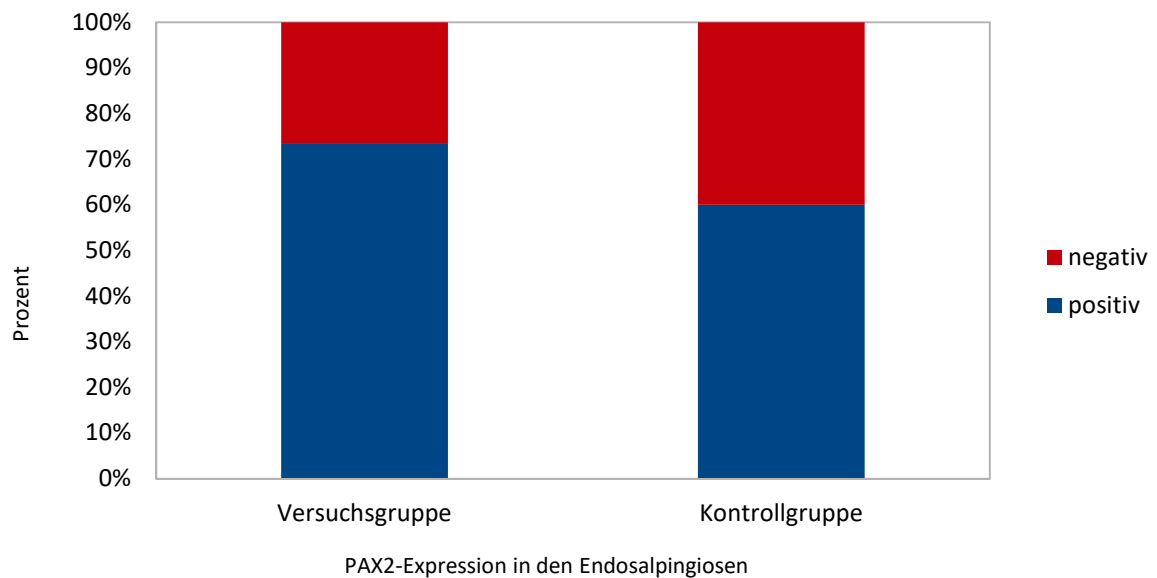


Abbildung 41: Prozentuale PAX2-Expression in den Endosalpingiosen, Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe

Lef1 färbte das Oberflächenepithel bei 14 Frauen (70 %) positiv. Das Protein war außerdem in 1 von 11 Inklusionszysten (9 %) und in 1 von 5 Endosalpingiosen (20 %) vorhanden. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe ergab sich nur in Bezug auf das Oberflächenepithel. Der Exakte Test nach Fisher zeigte einen p-Wert von 0,01 und lag damit unter dem festgesetzten p-Wert von 0,05. Dieses Ergebnis ist in der folgenden Tabelle sowie dem Balkendiagramm gezeigt. Zum Vergleich ist jeweils ein Ausschnitt aus einem Lef1-positiven Bereich des Oberflächenepithels aus der Versuchsgruppe, sowie aus einem Lef1-negativem Areal aus der Kontrollgruppe abgebildet.

Tabelle 24: Lef1-Expression im Oberflächenepithel, Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe, Exakter Test nach Fisher

	negativ	positiv	Gesamt	Exakte Signifikanz (2-seitig)
BRCA-Gruppe	2	41	43	
Kontrollgruppe	6	14	20	
Gesamt	8	55	63	
Exakter Test nach Fisher				0,01

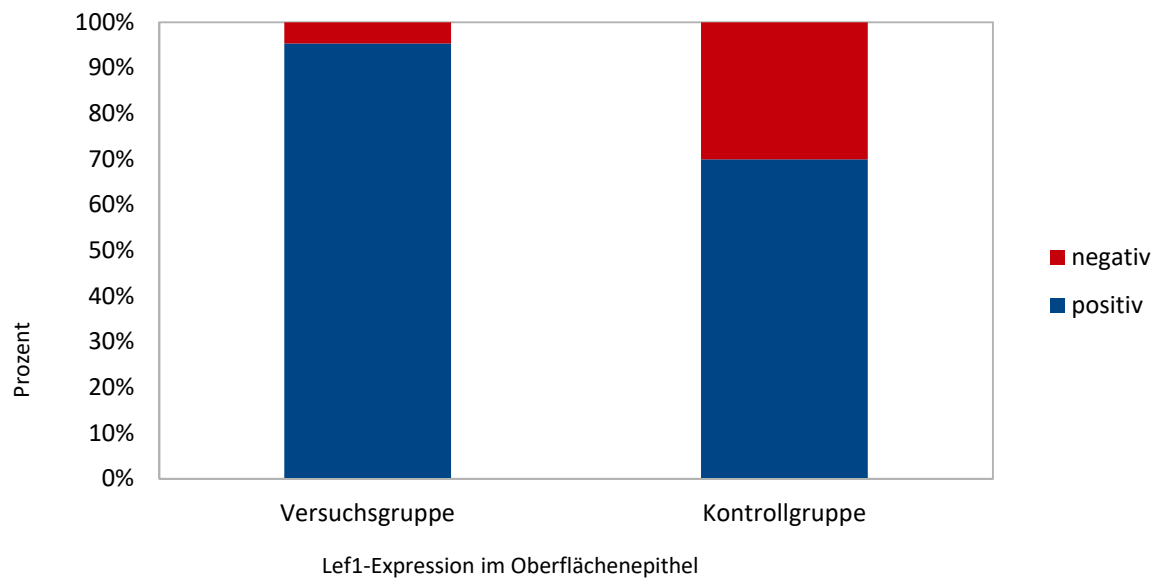


Abbildung 42: Prozentuale Lef1-Expression im Oberflächenepithel, Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe

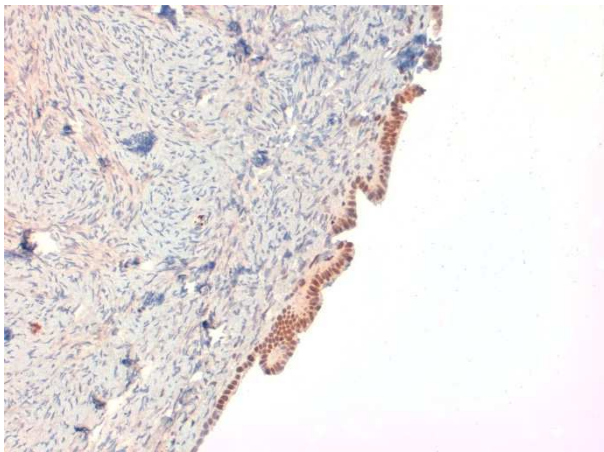


Abbildung 43: Lef1-positiv gefärbtes Oberflächenepithel, Versuchsgruppe, 200-fach vergrößert

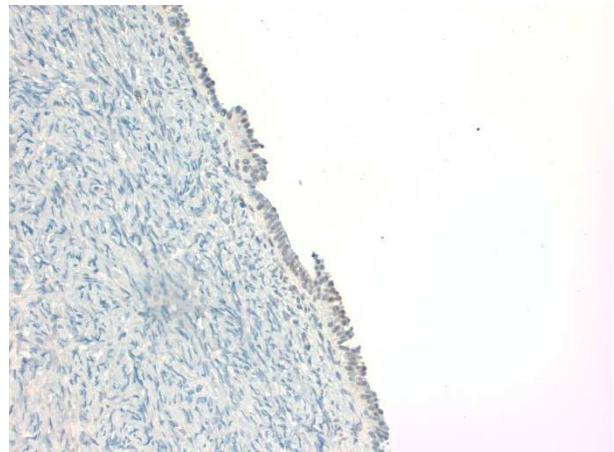


Abbildung 44: Lef1-negativ gefärbtes Oberflächenepithel, Kontrollgruppe, 200-fach vergrößert

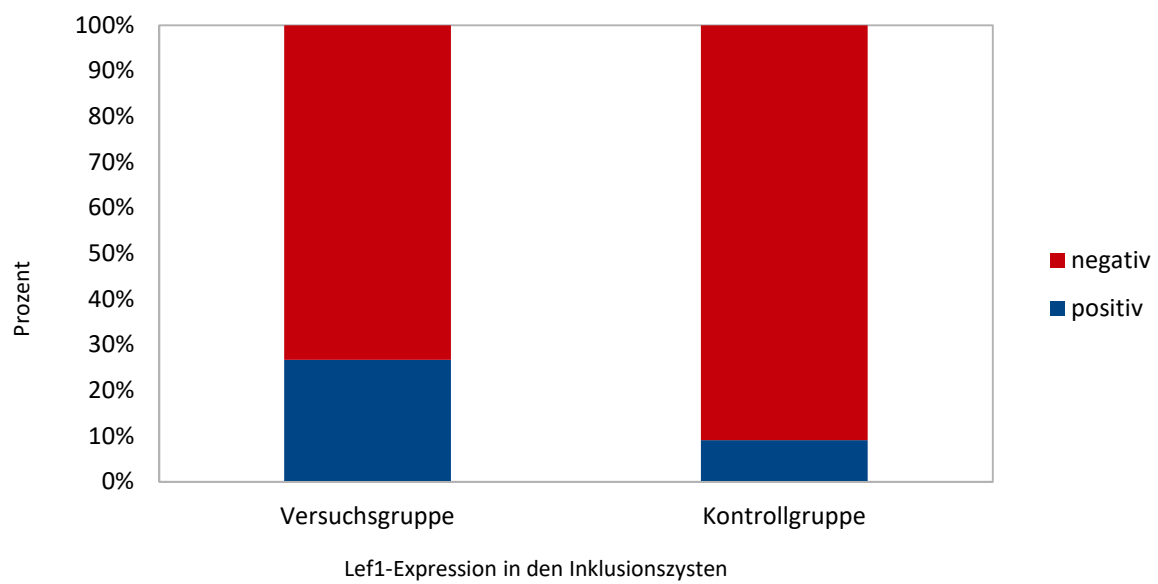


Abbildung 45: Prozentuale Lef1-Expression in den Inklusionszysten, Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe

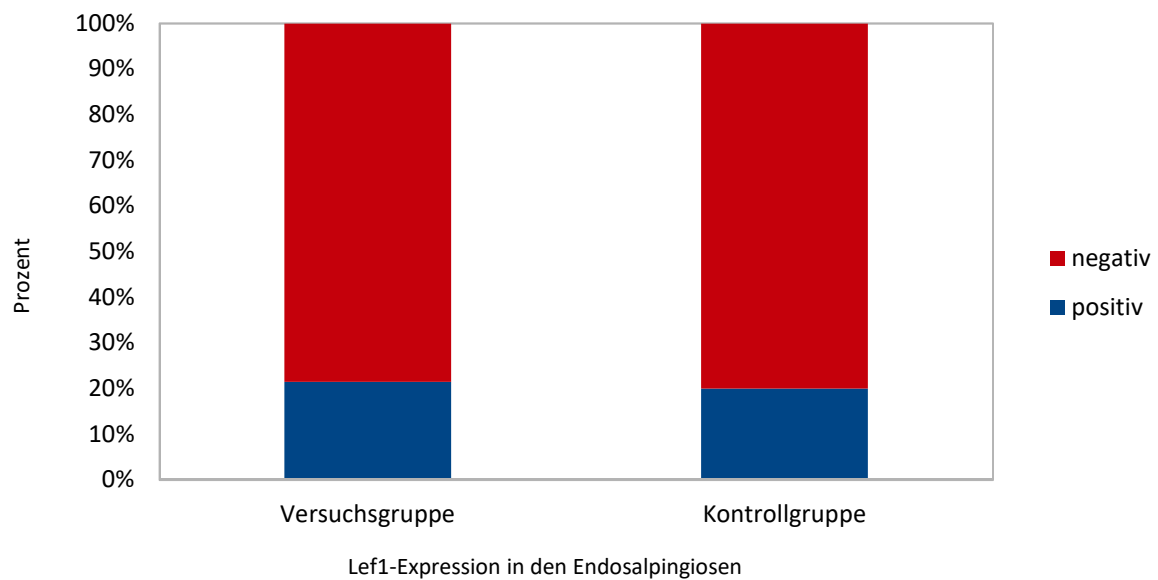


Abbildung 46: Prozentuale Lef1-Expression in den Endosalpingiosen, Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe

β -Catenin zeigte in der Kontrollgruppe, wie auch schon in der Versuchsgruppe, keine auffälligen Expressionsmuster.

In der ARID1A-Färbung konnte in der Kontrollgruppe in 2 von 20 Fällen (10 %) eine negative, also pathologische Färbung des Oberflächenepithels verzeichnet werden. Dieses Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass in beiden Fällen ein Endometriumkarzinom zur Adnexektomie führte. Bei diesen Tumoren wurde schon häufig ein Fehlen des Proteins beobachtet [Takeda, 2016]. Ansonsten zeigten sich keine Auffälligkeiten.

p53 färbte weder das Oberflächenepithel, noch die Inklusionszysten und die Endosalpingiosen positiv.

KI67 zeigte weder im Oberflächenepithel, noch in den Inklusionszysten und den Endosalpingiosen eine Überexpression.

Das Protein p16 war im Oberflächenepithel in 4 von 20 Fällen (20 %), in den Inklusionszysten in 4 von 11 Fällen (36 %) und in den Endosalpingiosen in 2 von 5 Fällen (40 %) vorhanden. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. In den nachfolgenden Diagrammen sind die Ergebnisse dargestellt.

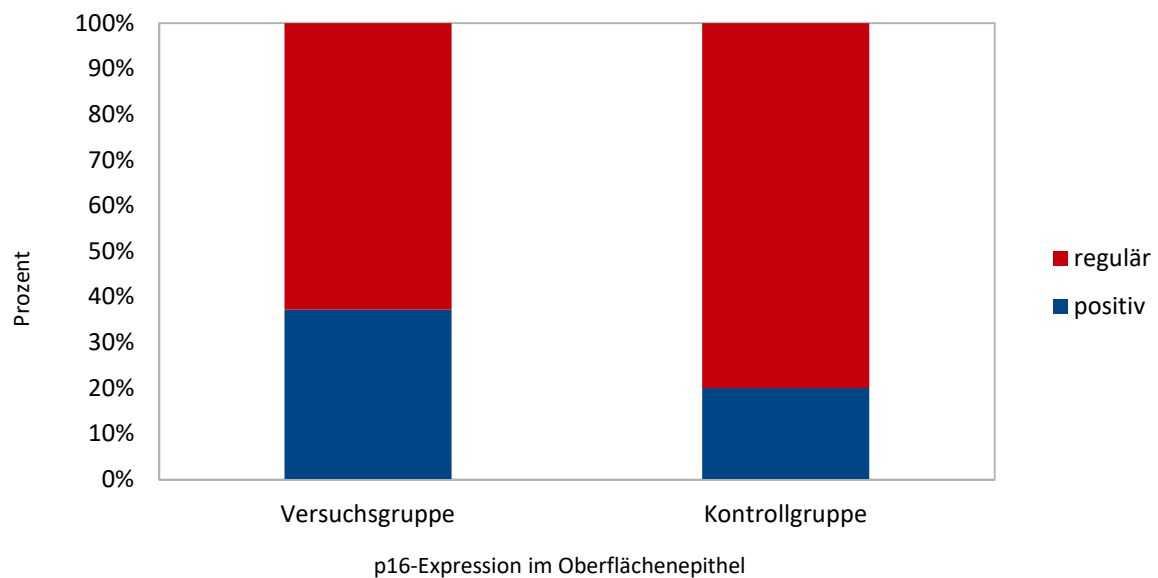


Abbildung 47: Prozentuale p16-Expression im Oberflächenepithel, Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe

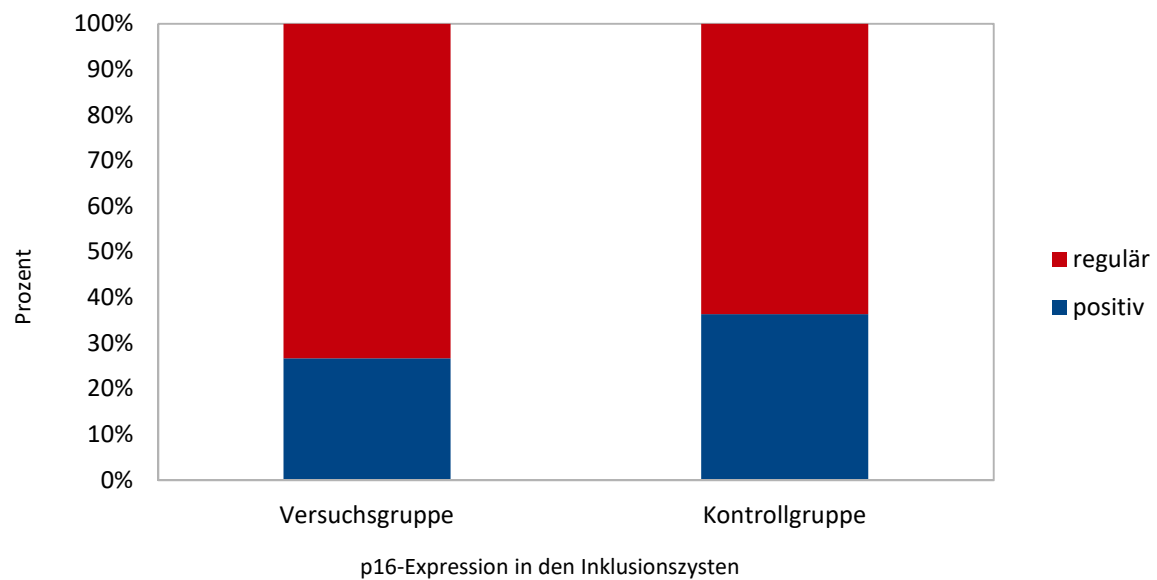


Abbildung 48: Prozentuale p16-Expression in den Inklusionszysten, Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe

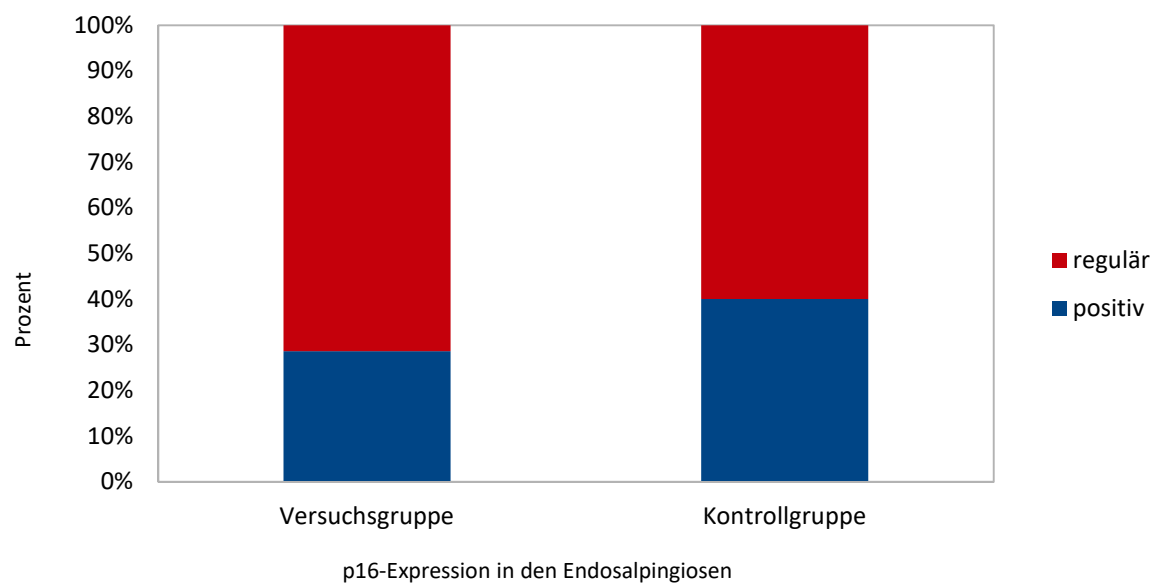


Abbildung 49: Prozentuale p16-Expression in den Endosalpingiosen, Vergleich Versuchs- und Kontrollgruppe

4. Diskussion

Patientinnen mit einer BRCA1- oder BRCA2-Genmutation haben ein erhöhtes Lebenszeitrisiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [Tumormannual, 2014]. Als protektive Maßnahme wird die PBSO empfohlen [Kauff, 2008]. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob in prophylaktisch entfernten Ovarien bereits histomorphologische oder immunhistochemische Veränderungen, also Vorläuferläsionen bestehen, die auf eine mögliche Entstehung von Tumoren hindeuten könnten. Weil BRCA-Mutationsträgerinnen vor allem HGSOCS entwickeln [Garg, 2013], wurde dieser Subtyp in den Fokus der Untersuchungen gestellt. Es sind einige Studien vorhanden, in denen die Expression von Proteinen in bereits diagnostizierten OCs untersucht wurden, etwa von p53 [Folkins, 2008] und PAX2 [Tong, 2007]. In dieser Arbeit wurden dagegen Auffälligkeiten im nicht neoplastischen Gewebe der Ovarien betrachtet. Dazu gibt es bisher nur wenige Studien, in denen häufig mit kleinen Fallzahlen (bis zu 30 Fällen) gearbeitet wurde [O'Neill, 2007], [Kerner, 2005], weil OCs im Gegensatz zu anderen Karzinomen eher selten vorkommen [Kurman, 2014] und komplette Adnexektomien ohne Tumorverdacht selten durchgeführt werden. Besser untersucht dagegen sind Veränderungen der Proteinexpression im Tubengewebe [Novak, 2015], [Chen, 2010], [Lee, 2007].

Histomorphologische Veränderungen

In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst das Auftreten von histomorphologischen Auffälligkeiten untersucht, die als Ursprungsorte für OCs in Frage kommen. Hierbei ist vor allem das Oberflächenepithel des Ovars, das Müller-Epithel, zu nennen. Man nimmt an, dass es sich zumindest zum Teil durch ovulatorische Traumen verändert und daraus Karzinome entstehen [Kurman, 2014]. Kerner et al. konnten in ihrer Studie, in der sie Ovarien von BRCA-Trägerinnen untersuchten, nachweisen, dass dort vermehrt atypische Veränderungen des Epithels, wie etwa papilläre Veränderungen, auftreten [Kerner, 2005]. Als weiterer Ausgangspunkt für die Entstehung von OCs werden Inklusionszysten gesehen. Diese weisen sowohl morphologisch als auch immunhistologisch eine große Ähnlichkeit mit dem Tubenepithel auf [Kurman, 2014]. In dieser Arbeit wurden in 29 von 43 Fällen, also in 67 Prozent, Inklusionszysten gefunden.

Gross et al. konnten zeigen, dass sich aus ihnen Ovarialtumoren entwickeln können [Gross, 2010]. In mehreren Studien konnte eine erhöhte Anzahl an CICs bei BRCA-Trägerinnen [Kerner, 2005], [Werness, 1999], sowie bei bereits diagnostiziertem OC festgestellt werden [Tresserra, 1998]. OCs können desweiteren aus Endosalpingiosen entstehen. Diese sind aus Epithelzellen vom tubulären Typ, die außerhalb der Tube liegen, aufgebaut [Kurman, 2011]. In der vorliegenden Arbeit wurden sie in 14 der 43 Fälle gefunden, das heißt in 33 Prozent. Mc Coubrey et al. haben gezeigt, dass seröse maligne Tumoren ihren Ursprung häufig in Endosalpingiosen haben [Mc Coubrey, 2005]. In 10-20 Prozent sind sie mit peritonealen Implantaten assoziiert, die wiederum mit BOTs in Verbindung gebracht werden [Ayhan, 2005]. Die Follikelzysten wurden in dieser Arbeit nur in Bezug auf das quantitative Vorkommen in den Ovarien der BRCA-Patientinnen untersucht. Diese wurden in 15 von 43 Fällen, also 35 Prozent, beobachtet. Pavone et al. konnten nachweisen, dass in den meisten Krebsläsionen Follikel aller Stadien vorhanden sind [Pavone, 2014]. Bei Patientinnen mit PCOS (Polyzystischem Ovarialsyndrom), bei denen überdurchschnittlich viele Zysten vorliegen, wurden zwar keine serösen, aber vermehrt endometrioiden Karzinome gefunden [Kurman, 2011]. Beim Vergleich der Versuchs- mit der Kontrollgruppe, also mit den Patientinnen ohne BRCA-Genmutationen, konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die histomorphologischen Veränderungen gefunden werden. Inklusionszysten waren dort in 11 von 20 Fällen (55 %), Endosalpingiosen in 5 von 20 Fällen (25 %) und Follikelzysten in 4 von 20 Fällen (20 %) vorhanden. Dieses Ergebnis könnte erstens dadurch bedingt sein, dass das Kontrollkollektiv mit 20 Frauen eine relativ geringe Fallzahl aufweist. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erhalten, müssten Studien mit einem größeren Stichprobenumfang durchgeführt werden. Zweitens ist es möglich, dass die Ovarien dieser Patientinnen bereits gewisse Läsionen zeigen, da sie größtenteils auf Grund von Endometriumkarzinomen, bei denen synchron OCs auftreten können [Tong, 2008], entnommen wurden. Dieses Problem ist aber nur schwer zu umgehen, weil die Adnexen nicht ohne entsprechende Indikation entnommen werden. Ob also die untersuchten histomorphologischen Veränderungen Zeichen von Vorläuferläsionen für ovarielle Tumoren sein können, muss weitergehend untersucht werden.

PAX8

PAX8 ist ein Transkriptionsfaktor und Marker für Tumoren des Müller-Epithels. In neoplastischen Vorgängen des Müller-Epithels wird es vermehrt exprimiert [Oczan, 2011]. In unserer Untersuchung war das Oberflächenepithel in 33 von 43 Fällen (77 %) fokal PAX8-positiv. Die Inklusionszysten zeigten in 27 von 29 Fällen (93 %) und die Endosalpingiosen in 13 von 14 Fällen (93 %) die Proteinexpression. Die Ergebnisse decken sich mit denen von Oczan et al. Sie wiesen nach, dass PAX8 in 89 % der Neoplasmen des Müller-Epithels und in 90 Prozent der Metastasen im Ovar vorhanden war [Oczan, 2011]. Eine weitere Studie von 2011 zeigte, dass 52 von 54 Müller'schen Mischtumoren, aber nur 4 von 98 Tumoren anderer Subtypen PAX8-positiv waren [Wiseman, 2011]. Bowen et al. wiesen nach, dass das Protein in allen CICs und Endosalpingiosen, die von gesundem tubären Epithel abstammten, exprimiert wird. Außerdem fanden sie es in drei Subtypen des OCs, nämlich im serösen, endometrioiden und klarzelligen OC [Bowen, 2007]. In der Kontrollgruppe wurde PAX8 im Oberflächenepithel bei 7 von 20 Patientinnen, also 35 Prozent, sowie zu jeweils 100 Prozent in den Inklusionszysten und Endosalpingiosen gefunden. Der Unterschied in den Kollektiven in Bezug auf das Oberflächenepithel ist mit einem p-Wert von 0,002 statistisch signifikant. PAX8-positiv gefärbte Bereiche im Müller-Epithel des Ovars könnten also auf Veränderungen, die mit der Entstehung eines Karzinoms in Verbindung stehen, hindeuten. Die Proteinexpression in den Inklusionszysten wird als physiologisch angesehen [Oczan, 2011]. In den Endosalpingiosen deutet das Vorkommen von PAX8 auf einen Ursprung aus tubarem Epithel hin [Bowen, 2007]. Da diese in der vorliegenden Studie aber sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe in der Mehrzahl positiv waren, scheinen sie als Vorläuferläsionen eher nicht in Frage kommen.

PAX2

Der Transkriptionsfaktor PAX2 wird in der Karzinogenese der Müller-Organen reaktiviert [Patricio, 2013]. Das Protein wurde in 9 der 43 Fälle (21 %) im Oberflächenepithel, in 21 der 29 Inklusionszysten (72 %) und in 11 der 13 Endosalpingiosen (85 %) exprimiert. Wiseman et al. zeigten, dass 96 Prozent der Karzinome, die aus dem Müller-Epithel entstanden waren, PAX2-positiv sind [Wiseman, 2011].

In einer weiteren Studie von 2007 wurde beobachtet, dass das Protein in 67 Prozent der ovariellen papillären serösen Karzinome exprimiert wird [Tong, 2007]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weichen davon insofern ab, dass PAX2 nur in einem kleinen Teil der Epithelzellen, nämlich in 21 Prozent, positiv war. Chen et al. fanden das Protein wiederum auch eher selten in OCs [Chen, 2010]. Die Inklusionzysten waren in dieser Arbeit zu 72 Prozent PAX2-positiv gefärbt. Das Ergebnis steht im Widerspruch mit der Studie von Tong et al., die das Protein in keiner einzigen CIC nachweisen konnten [Tong, 2007]. Diese Diskrepanzen zwischen den einzelnen Studien könnten mit den jeweils kleinen Fallzahlen zusammenhängen. Die Proteinexpression in Endosalpingiosen wird als physiologisch angesehen [Tong, 2007], was das Ergebnis dieser Arbeit, nämlich einer PAX2-Positivität von 93 %, bestätigt. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Das Oberflächenepithel war in 1 von 20 Fällen (5 %), die Inklusionszysten in allen 11 Fällen (100 %) und die Endosalpingiosen in 3 von 5 Fällen (60 %) positiv. Mit den bisherigen Studien können also keine aussagekräftigen Schlussfolgerungen darüber gezogen werden, ob eine PAX2-Expression auf Vorläuferläsionen ovarieller Tumoren hindeutet.

Lef1

Lef1 steht in Zusammenhang mit vielen Karzinomen, auch mit dem HGSOE [Kim, 2002]. Es bildet im Rahmen des Wnt-Signalwegs zusammen mit β -Catenin einen Komplex im Zellkern [Hülsken, 2000]. Deswegen kommt es oft zur Expressionskorrelation der beiden Proteine [Rask, 2003]. In der vorliegenden Arbeit zeigte das Oberflächenepithel bei 41 von 43 Patientinnen (95 %) eine positive Färbung, die Inklusionszysten in 8 von 29 (28 %) und die Endosalpingiosen in 3 von 13 Fällen (23 %). In einer Studie von 2012 konnte nachgewiesen werden, dass in 67 Prozent der serösen OCs eine Lef1-Überexpression existiert, in anderen Subtypen, wie etwa dem Klarzellkarzinom dagegen nicht [Huang, 2012]. In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass das Protein ausschließlich in Karzinomzellen, nicht aber in gesunden Zellen vorkommt [Clements, 2011], [Rask, 2003]. Beim Vergleich mit den Nicht-BRCA-Trägerinnen zeigte sich im Oberflächenepithel in 14 von 20 Fällen (70 %), bei 1 von 11 Inklusionszysten (9 %) und bei 1 von 5 Endosalpingiosen (20 %) eine Lef1-Überexpression.

Es konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf das Oberflächenepithel festgehalten werden (p-Wert 0,01). Die Lef1-Expression könnte also einen Hinweis darauf geben, dass Vorläuferläsionen von OC's im Oberflächenepithel auftreten. Im Fall der Inklusionszysten, sowie der Endosalpingiosen konnten zwar auffällige Färbemuster beobachtet werden, allerdings hatten diese im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv keine statistische Signifikanz.

β-Catenin

β-Catenin wird mit vielen malignen Tumoren assoziiert, darunter auch dem Ovarialkarzinom [Miron, 1999]. In dieser Arbeit konnte in keinem Fall eine nukleäre β-Catenin-Färbung verzeichnet werden. Sowohl das Oberflächenepithel, als auch die Inklusionszysten und die Endosalpingiosen waren ausschließlich zytoplasmatisch gefärbt. Dies gilt als physiologisch, weil β-Catenin in geringen Konzentrationen im Zytoplasma von morphologisch unauffälligem Gewebe vorkommt [Barbolina, 2011]. Ist der Wnt-Signalweg aktiviert, tritt es in stärkerer Konzentration im Zellkern auf, weil sich das Protein dort akkumuliert und mit Lef1 einen Komplex bildet [Hülsken, 2000]. Auch in der Kontrollgruppe konnte keine pathologische Proteinexpression nachgewiesen werden. In einer Studie von 2009 konnte in 95,8 Prozent der Ovarialtumoren ein nukleäres Vorhandensein von β-Catenin nachgewiesen werden, in der Kontrollgruppe dagegen nicht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen malignen (74,3 %) und benignen (52,3 %) Tumoren nachgewiesen werden [Filho, 2009]. Rask et al. wiesen ein höheres Vorkommen des Proteins in OCs als in gesunden Ovarien nach. Außerdem fanden sie heraus, dass zwischen dem Auftreten von Lef1 und β-Catenin eine Korrelation besteht [Rask, 2003], was aus der Komplexbildung der beiden Proteine beim aktivierten Wnt-Signalweg resultiert [Hülsken, 2000]. Diese Ergebnisse weichen also von denen der vorliegenden Arbeit ab. Die unterschiedlichen Beobachtungen lassen sich vielleicht damit erklären, dass eine pathologische Expression des Proteins vor allem auf endometrioiden OCs zurückzuführen ist [Dubeau, 2008]. Bei BRCA-Genmutationen entwickeln sich dagegen häufig HGSOEs, die anderen Subtypen weniger oft [Garg, 2013].

ARID1A

ARID1A ist in die Zelldifferenzierung und Gewebeentwicklung involviert. Außerdem gehört es zum CUK. Eine Inaktivierung, also ein Fehlen von Mitgliedern des CUK's wird mit Malignität in Verbindung gebracht [Takeda, 2016]. Auch bei dieser Färbung konnten in der vorliegenden Studie keine auffälligen Beobachtungen gemacht werden. In allen drei untersuchten histomorphologischen Läsionen wurden ausschließlich positiv, also physiologisch gefärbte Areale gefunden. In der Kontrollgruppe war das Oberflächenepithel in 2 von 20 Fällen (10 %) negativ, das heißt also pathologisch verändert. In beiden Fällen führte ein Endometriumkarzinom zur Adnexektomie. Weitere Auffälligkeiten waren nicht nachweisbar. In einer Studie von 2015 konnte gezeigt werden, dass die Expression von ARID1A in 22 Prozent der endometrioiden und in 47 Prozent der Klarzellkarzinome fehlt [Chene, 2015]. Lowery et al. konnten in ihren Untersuchungen nachweisen, dass es in 41 Prozent der untersuchten Klarzellkarzinome und in 48 Prozent des endometrioiden Subtyps zu einem Verlust der ARID1A-Expression kommt [Lowery, 2012]. Dass in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf dieses Protein keine Auffälligkeiten festgestellt werden konnten, könnte daran liegen, dass es sich hier nicht um Vorläuferläsionen des endometrioiden oder Klarzell-OCs handelt. Diese Subtypen zeigen, wie in Studien aufgeführt, am häufigsten Abnormalitäten in der Proteinexpression. Das Ergebnis der Kontrollgruppe könnte damit erklärt werden, dass ARID1A beim Endometriumkarzinom häufig fehlt [Takeda, 2016]. Das könnte sich auch auf die untersuchten Ovarien ausgewirkt haben.

p53

Das für p53 kodierende Gen *TP53* ist ein Tumorsuppressorgen und wird als Marker für maligne Tumoren vieler Organe verwendet. In den Ovarien fällt auf, dass in den HGSOCS eine aberrante p53-Expression vorkommt [Kurman, 2014]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten keine Auffälligkeiten in Bezug auf dieses Protein. Sowohl im Oberflächenepithel, als auch in den Inklusionszysten und den Endosalpingiosen lag ein physiologisches Expressionsmuster vor. In mehreren Studien über STICs (Seröse tubare intraepitheliale Karzinome), die als direkte Vorläuferläsionen von HGSOCS gelten, wurde eine aberrante p53-Expression gefunden [George, 2014], [Gross, 2010].

In einer Untersuchung von 2005 wurde gezeigt, dass das Protein in den Inklusionszysten der Ovarien von BRCA-Trägerinnen häufiger vorkommt als bei gesunden Patientinnen [Kerner, 2005]. Mit den genannten Studien decken sich unsere Resultate nicht. Die fehlende p53-Expression in den beschriebenen Läsionen könnte darauf hinweisen, dass eine p53-Mutation kein frühes Ereignis in der Genese des Ovarialkarzinoms ist.

KI67

KI67 ist ein Zellproliferationsmarker. Er ist in den aktiven Phasen der Zellteilung vorhanden [Scholzen, 2000]. Da Tumorgewebe eine hohe Teilungsrate aufweist, ist das Protein dort in der Regel zu finden [Lelle, 1990]. Es wird verstärkt in malignen Neoplasmen exprimiert, in benignen oder reaktiven Läsionen seltener [Garzetti, 1995]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine KI67-Überexpression in keiner der histomorphologischen Läsionen nachgewiesen werden, weder im Oberflächenepithel, noch in den Inklusionszysten oder den Endosalpingiosen. Auch in der Kontrollgruppe wurden keine auffälligen Beobachtungen gemacht. George et al. konnten in ihrer Studie nachweisen, dass nur in einem kleinen Teil, nämlich in 10 Prozent, der STICs, die als Vorläufer der HGSOCS gelten, eine KI67-Überexpression vorkommt [George, 2014]. In einer Untersuchung von 2005, die die Ovarien von 50 BRCA-Trägerinnen untersuchte, konnten auch keine Auffälligkeiten im Vorhandensein des Proteins nachgewiesen werden [Kerner, 2005]. Die Ergebnisse dieser Publikationen decken sich mit denen der vorliegenden Arbeit.

p16

Das Gen, das für p16 kodiert, ist ein Tumorsuppressorgen [Novak, 2015]. Vor allem in HGSOCS wird das Protein überexprimiert, in den anderen Subtypen dagegen weniger [Prat, 2014]. Im Oberflächenepithel konnte es in 16 von 43 Fällen (37 %) nachgewiesen werden, in 8 von 29 Inklusionszysten (28 %) und in 4 von 13 Endosalpingiosen (31 %). In einer Studie von 2016, in der die p16-Expression in HGSCs (High-grade serösen Karzinomen) sowohl des Ovars, als auch der Tuben untersucht wurden, konnte in 43 Prozent der Fälle eine fokal positive und in 55 Prozent eine diffus positive Färbung nachgewiesen werden [Beirne, 2016].

In einer weiteren Untersuchung mit insgesamt 31 Fällen (STICs, HGSOCs und morphologisch unauffälligen Tuben) wurde eine Genexpression im Großteil der STICs und begleitend aufgetretenen HGSOCs dokumentiert [Novak, 2015]. In unauffälligem Tubenepithel wurden nur einzeln verstreute, p16-positive Zellen entdeckt [Novak, 2015]. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der vorliegenden Arbeit. Die Kontrollgruppe zeigte im Oberflächenepithel in 4 von 20 Fällen (20 %), in den Inklusionszysten in 4 von 11 Fällen (36 %) und in den Endosalpingiosen in 2 von 5 Fällen (40 %) eine p16-Überexpression. Im Vergleich der beiden Kollektive bestand also keine statistische Signifikanz. Auch Kerner et al. konnten keine signifikanten Unterschiede im Vorhandensein des Proteins im Oberflächenepithel und in den Inklusionszysten zwischen der Gruppe der BRCA-Mutationsträgerinnen und der gesunden Kontrollgruppe feststellen [Kerner, 2005]. Zusammenfassend kann man sagen, dass zwar pathologische Veränderungen in der p16-Expression gezeigt werden konnten, diese allerdings im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv keine statistische Signifikanz aufwiesen.

Abschließend kann festgehalten werden, dass bei zwei der acht untersuchten Proteine, nämlich PAX8 und Lef1, Hinweise auf Vorläuferläsionen ovarieller Tumoren bei BRCA-Trägerinnen vorliegen. Beim Vergleich der Versuchs- mit der Kontrollgruppe traten statistisch signifikante Unterschiede nur im Oberflächenepithel der Ovarien auf. Somit kann angenommen werden, dass BRCA-Patientinnen im Vergleich zu Frauen ohne diese Genmutationen bereits Veränderungen in den Ovarien aufweisen, die auf Vorläuferläsionen von Ovarialkarzinomen hindeuten könnten.

Ob es auch in den anderen Färbungen signifikante Unterschiede zwischen BRCA- und Nicht-BRCA-Patientinnen gibt, konnte in dieser Studie nicht ausreichend beurteilt werden. Um herauszufinden, ob solche bestehen oder ob es keine weiteren Auffälligkeiten gibt, müsste man versuchen, ein Kontrollkollektiv aus Patientinnen ohne urogenitale Vorerkrankungen oder Tumoren aufzubauen. Das allerdings wird sich als schwierig erweisen, da ohne entsprechende Indikation keine Adnexektomie erfolgen wird. Weiterhin sollten Untersuchungen mit deutlich höheren Fallzahlen in der Versuchs- sowie in der Kontrollgruppe durchgeführt werden.

Dazu könnte überlegt werden, ob man Kooperationen von mehreren Kliniken eingeht, um möglichst viele Ovarien von Patientinnen mit nachgewiesener BRCA-Genmutation, aber ohne bereits diagnostizierter Ovarialkarzinome zu sammeln. Neue Studien könnten auf weitere histomorphologische Veränderungen, wie etwa eine Rete ovarii oder Fimbrienepithel der Tuben, das mit der Oberfläche des Ovars verwachsen ist, ausgeweitet werden. Außerdem sollte bedacht werden, dass es sich bei der vorliegenden um eine rein immunhistochemische Studie handelt. Oft können genetische Veränderungen allerdings weder morphologisch noch immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zu BRCA-bedingten Läsionen in den Ovarien könnten also mit einer anderen Methodik weitergeführt werden, zum Beispiel einer Mutationsanalyse für einzelne Gene. Auch in der Immunhistochemie selbst sind weitere, in Bezug auf die Fragestellung interessante Marker vorhanden, wie etwa die BRCA-Marker selbst.

5. Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom kommt zwar mit einem Anteil von 4,5 Prozent an allen malignen Tumorerkrankungen eher selten vor [Kurman, 2014], gehört jedoch wegen seiner ungünstigen Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 40 Prozent zu den häufigsten Krebstodesursachen der Frau [TMR, 2013]. Im Rahmen der genetischen Disposition für das Karzinom sind vor allem Mutationen des BRCA1- und BRCA2-Gens zu erwähnen. Durch sie erhöht sich das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, stark [Tumormanual, 2014]. Aus diesem Grund wird Patientinnen mit nachgewiesener BRCA-Mutation die prophylaktische Salpingo-Oophorektomie empfohlen [Kauff, 2008].

Das Ziel der Studie war es, herauszufinden, ob histomorphologische oder immunhistochemische Veränderungen in präventiv entnommenen Adnexen von BRCA-Mutationsträgerinnen nachweisbar sind, die auf die Entstehung von Ovarialtumoren hinweisen. Hierzu wurde zuerst in der HE-Färbung nach Auffälligkeiten im Oberflächenepithel der Ovarien, nach Inklusionszysten, Endosalpingiosen und Follikelzysten gesucht. Das veränderte Oberflächenepithel, die Inklusionszysten und die Endosalpingiosen wurden mit Hilfe der immunhistochemischen Marker PAX8, PAX2, Lef1, β -Catenin, ARID1A, p53, KI67 und p16 analysiert. Die Follikelzysten sollten nur auf ihr quantitatives Vorliegen hin untersucht werden, da sie keine Ausgangspunkte für Ovarialkarzinome darstellen, allerdings in Zusammenhang mit Tumoren häufiger auftreten als in gesunden Ovarien [Pavone, 2014]. Die Ergebnisse wurden abschließend mit einem Kontrollkollektiv verglichen. In die Versuchsgruppe der Studie wurden 43 Patientinnen mit einer nachgewiesenen BRCA-Mutation und unter Ausschluss eines bereits vorhandenen Ovarialkarzinoms einbezogen. Die Kontrollgruppe bestand aus 20 Frauen ohne BRCA-Genmutation. Das in Paraffinblöcke eingebettete, geschnittene und auf Objektträger aufgebrachte Gewebe wurde histomorphologisch und immunhistochemisch ausgewertet.

Histomorphologisch zeigte sich, dass in 67 Prozent (29 von 43 Fällen) Inklusionszysten, in 33 Prozent (14 von 43 Fällen) Endosalpingiosen und in 35 Prozent (15 von 43 Fällen) Follikelzysten vorhanden waren. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe konnten in dieser quantitativen Analyse des veränderten Gewebes nicht nachgewiesen werden.

Eine PAX8-Expression im Oberflächenepithel wurde in 77 Prozent (33 von 43 Fällen), in 93 Prozent der Inklusionszysten (27 von 29) und in 93 Prozent der Endosalpingiosen (13 von 14) gefunden. In den Inklusionszysten und Endosalpingiosen kommt die Proteinexpression physiologisch vor [Bowen, 2007]. In veränderten Oberflächenepithel wird sie allerdings als pathologisch eingestuft und auch im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von 0,002. In der PAX2-Färbung war das Oberflächenepithel in 21 Prozent (9 Fällen), die Inklusionszysten in 72 Prozent (21 Fällen) und die Endosalpingiosen in 73 Prozent (11 Fällen) positiv, was auf keine pathologischen Färbemuster hindeutet. Lef1 war im Oberflächenepithel in 95 Prozent (41 von 43 Fällen), in den Inklusionszysten in 27 Prozent (8 Fälle) und in den Endosalpingiosen in 21 Prozent (3 Fälle) überexprimiert. Die Überexpression im Oberflächenepithel zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe einen statistisch signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von 0,01. In den Färbungen β -Catenin, ARID1A, p53 und KI67 konnten keine auffälligen Expressionsmuster nachgewiesen werden. In der p16-Färbung war das Oberflächenepithel in 37 Prozent (16 Fälle), die Inklusionszysten in 27 Prozent (8 Fälle) und die Endosalpingiosen in 29 Prozent (4 Fälle) positiv. Diese Ergebnisse waren aber im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant.

Sowohl in der PAX8-, als auch in der Lef1-Färbung konnte mit statistisch signifikanter Relevanz immunhistochemisch verändertes Oberflächenepithel nachgewiesen werden. Dies könnte auf potentielle Vorläuferläsionen in den Ovarien von BRCA-Trägerinnen hinweisen. Um eine höhere Aussagekraft zu erhalten, müssten allerdings Studien mit deutlich höherer Fallzahl als in der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden oder auch weitere Methodiken, wie etwa eine Mutationsanalyse der einzelnen Gene angewandt werden.

Literaturverzeichnis

1. Al Bakir M, Gabra H. The molecular genetics of hereditary and sporadic ovarian cancer: implications for the future. *Br Med Bull.* 2014; 112: 57-69
2. Attila M, Kosma VM, Ji H. Clinical significance of alpha-catenin, collagen IV, and KI-67 expression in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 1998; 16: 2591-2600
3. Ayhan A, Guven ESG, Guven S, Kukukali T. Recurrence and prognostic factors in borderline ovarian tumors. *Gynecol Oncol.* 2005; 98: 439-445
4. Barbolina MV, Burkhalter RJ, Sharon SM. Diverse mechanisms for activation of Wnt signalling in the ovarian tumour microenvironment. *Biochem J.* 2011; 437(1): 1-12
5. Beirne JP, Mc Art DG, James J, Salto-Tellaz M, Maxwell P, Mc Cluggage WG. p16 as a prognostic indicator in ovarian/ tubal high-grade serous carcinoma. *Histopathology.* 2016; 68(4): 615-618
6. Bolton KL, Chenevix-Trench G, Goh C, Sadetzki S, Ramus SJ, Karlan BY, Lambrechts D, Despierre E, Barrowdale D, Mc Guffog L, et al. Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *American Medical Association.* 2012; 307(4): 382-390
7. Bowen NJ, Logani S, Dickersen EB, Kapa LB, Akhtar M, Benigno BB, Mc Donald JF. Emerging roles for PAX8 in ovarian cancer and endosalpingeal development. *Gynecol Oncol.* 2007; 104(2): 331-337
8. Burghaus S, Häberle L, Schrauder M, Heusinger K, Thiel F, Hein A, Wachter D, Strehl J, Hartmann A, Ekici A, Renner S, Beckmann M, Fasching P. Endometriosis as a risk factor for ovarian or endometrial cancer - results of a hospital-based case-control study. *BMC Cancer.* 2015; 15: 751
9. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis of ovarian cancer. *Nature.* 2011; 474: 609-615
10. Carben AD, Nehhozina T, Garg K, Vallejo CE, Brogi E. Endosalpingiosis in axillary lymph nodes: a possible pitfall in the staging of patients with breast carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2010; 34(8): 1211-1216
11. Chen EY, Mehra K, Mehrad M, Ning G, Miron A, Mutter GL, Monte N, Quade BJ, McKean FD, Yassin Y, Xian W, Crum CP. Secretory cell outgrowth, PAX2 and serous carcinogenesis in the fallopian tube. *J Pathol.* 2010; 222(1): 110-116

12. Chene G, Ouellet V, Rahimi K, Borres V, Provencher D, Mes-Masson AM. The ARID1A pathway in ovarian clear cell and endometrioid carcinoma, contiguous endometriosis, and benign endometriosis. *Int J Gynecol Obstet.* 2015; 130: 27-30
13. Clapier CR, Cairns BR. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Bioch.* 2009; 78: 273-304
14. Clements A, Engel D, Shelton D, Neff T, Park S, Bender D, Ahmed A, Geest Kd, Button A, Engelhardt J, Goodheart M. Lymphoid enhancing factor 1(=Lef-1) overexpression in epithelial ovarian, fallopian tube and peritoneal cancers and associations with clinical factors. *Gynecol Oncol.* 2011; 123(2): 437
15. Dubeau L. The cell origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncol.* 2008; 9: 1191-1197
16. Elias KM, Emori M, Westerling T, Long H, Li F, Mc Duffie E, Holman A, Lawney B, Quackenbush J, Brown M, Drapkin R. PAX8 and lineage dependence in high grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2015; 139(3): 591-592
17. Ewald-Riegler N, Scheil-Bertram S, Bois Ad. Borderline-Tumoren des Ovars. *TumorDiagn u Ther.* 2012; 33(5): 268-278
18. Filho OC, Oliveira Lima Fd, Oliveira Costa Hd, Sousa Damião Rd, Gomes TS, Gonçalves WJ. Canonical and noncanonical Wnt pathway: A comparison among normal ovary, benign ovarian tumor and ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2009; 21: 313-320
19. Folkins A, Jarboe E, Saleemuddin A, Lee Y, Callahan M, Drapkin R, Garber J, Muto M, Tworoger S, Crum C. A candidate precursor to pelvic serous cancer (p53 signature and its prevalence in ovaries and fallopian tubes from women with hereozygous brca mutations. *Gynecol Oncol.* 2008; 109(2): 168-173
20. Garg K, Levine DA, Olvera N, Dao F, Bisogna M, Secord AA, Berchuck A, Cerami E, Schultz N, Soslow RA. BRCA1 immunohistochemistry in a molecularly characterized cohort of ovarian carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2013; 37(1): 138-146
21. Garzetti GG, Ciavattini A, Goteri G. KI67 antigen immunostaining (MIB 1 monoclonal antibody) in serous ovarian tumors: index of proliferative activity with prognostic significance. *Gynecol Oncol.* 1995; 56: 169-174
22. Gatliffe TA, Monk BJ, Platinius K, Holeombe RF. Wnt signaling in ovarian tumorigenesis. *Int J Gynecol Cancer.* 2008; 18: 954-962

23. George SH, Shaw P. BRCA and early events in the development of serous ovarian cancer. *Front Oncol.* 2014; 4: 5
24. Gevensleben H, Serce N, Büttner R. Hereditäre Mamma-und Ovarialkarzinome. 2010; 31: 438-444
25. Gorp Tv, Amant F, Neven P, Vergote I, Moerman P. Endometriosis and the development of malignant tumours of the pelvis. A review of literature. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004; 18(2): 349-371
26. Groen RS, Gershenson DM, Fader AN. Updates and emerging therapies for rare epithelial ovariancancers: One size no longer fits it all. *Gynecol Oncol.* 2015; 136(2): 373-383
27. Gross A, Kurman RJ, Vang R, Shih I, Visvanathan K. Precursor lesions of high-grade serous ovarian carcinoma: morphological and molecular characteristics. *J Oncol.* 2010; 126295: 1-9
28. Hennessy BT, Timms KM, Carey MS, Gutin A, Meyer LA, Flake II DD, Abkevich V, Potter J, Pruss D, Glonn P, Li Y, Li J, Gonzalez-Angulo AM, Mc Cune KS, Markman M, Broaddus RR, Lanchburry JS, Lu KH, Mills GB. Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly(ADP ribose). *J Clin Oncol.* 2010; 28(22): 3570-3576
29. Höhn AK, Eienkel J, Wittekind C, Horn LC. Neue FIGO-Klassifikation des Ovarial-, Tuben- und primären Peritonealkarzinoms. *Pathologe.* 2014; 35: 322-326
30. Huang FI, Chen YL, Chang CN, Yuan RH, Jorg YM. Hepatocyte growth factor activates Wnt pathway by transcriptional activation of LEF1 to facilitate tumor invasion. *Carcinogenesis.* 2012; 33(6): 1142-1148
31. Hülsken J, Behrens J. The Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science.* 2000; 113(20): 3545
32. Hyman DM, Zhou Q, Iasonos A, Grisham RN, Arnold AG, Phillips MF, Bhatia J, Levine DA, Aghajanian C, Offit K, Barakat RR, Spriggs DR, Kauff ND. Improved survival for BRCA2-associated serous ovarian cancer compared with both BRCA-negativ and BRCA1-associated serous ovarian cancer. *Cancer.* 2012; 118(15): 3703-3709

33. Kauff ND, Barakat RR. Risk-Reducing Salpingo-Oophorectomy in Patients With Germline Mutations in BRCA 1 or BRCA 2. *J Clin Oncol*. 2007; 25(20): 2921-2927
34. Kauff ND, Domchek SM, Friebel TM, Robson ME, Lee J, Garber JE, Isaacs C, Evans DG, Lynch H, Eeles RA, Neuhausen SL, Daly MB, Matloff E, Blum JL, Sabbatini P, Barakat RR, Hudis C, Norton L, Offit K, Rebbeck TR. Risk-reducing salpingo-oophorectomy for the prevention of BRCA1- and BRCA2-associated breast and gynecologic cancer: a multicenter prospective study. *J Clin Oncol*. 2008; 26(8): 1331-1337
35. Kerner R, Sabo E, Gershoni-Baruch R, Beck D, Ben-Izhak O. Expression of cell cycle regulatory proteins in ovaries prophylactically removed from Jewish Ashkenazi BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Correlation with histopathology. *Gynecol Oncol*. 2005; 99(2): 367-375
36. Kim K. Direct evidence for a role of β -catenin/Lef-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int*. 2002; 26: 463-476
37. Klöppel G, Kreipe HH, Remmele W. Pathologie. Verdauungstrakt und Peritoneum. 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin 2013; 952
38. Konstantinopoulos PA, Spentzos D, Karlan BY, Taniguchi T, Fountzilas E, Francoeur N, Levine DA, Cannistra SA. Gene expression profile of BRCAness that correlates with responsiveness to chemotherapy and with outcome in patients with epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 3555-3561
39. Kurman RJ, Carnangiu ML, Herrington CS, Young RH. WHO classification of tumours of female reproductive organs. 4. Auflage, International Agency for Research on Cancer, Lyon 2014; 12-23
40. Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM. Blaustein's pathology of the female genital tract. 6. Auflage, Springer-Verlag, New York 2011; 664, 679-784, 588-609
41. Lang G. Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. 2. Auflage, Springer-Verlag, Wien 2013; 444
42. Lee Y, Miron A, Drapkin R, Nurci MR, Medeiros F, Saleemuddin A, Garber J, Birch C, Mou H, Gordon RW, Cramer DW, McKean FD, Crum CP. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J Pathol*. 2007; 211: 26-35

43. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. 2012; Langversion 3.0, AWMF-Registrier-Nummer: 032-0450L
44. Leitlinienprogramm Onkologie: Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren. 2016; Langversion 2.0, AWMF-Registernummer: 032/0350L
45. Lelle RJ. In situ determination of the KI-67 growth fraction (KI-67 GF) in human tumors (studies in breast cancer). *Acta Histochem, Suppl.* 1990; 39: 109-124
46. Lowery WJ, Schildkraut JM, Akushevich L, Bentley R, Marks JR, Huntsman D, Berchuck A. Loss of ARID1A-associated protein expression is a frequent event in clear cell and endometrial ovarian cancers. *Int J Gynecol Cancer.* 2012; 22(1): 9-14
47. Mackelenbergh M, Maass N, Jonat W, Hilpert F. Ovarialkarzinom und Präkanzerosen. *Gynäkologe.* 2015; 48: 415-421
48. Mc Cluggage WG. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in cervical pathology. *Pathology.* 2007; 39(1): 97-111
49. Mc Coubrey A, Houghton O, Mc Callion K, Mc Cluggage WG. Serous adenocarcinoma of the sigmoid mesentery arising in cystic endosalpingiosis. *J Clin Pathol.* 2005; 58: 1221-1223
50. Mc Kenney JK, Desai S, Cohen C, Amin MB. Discriminatory immunohistochemical staining of urothelial carcinoma in situ and non-neoplastic urothelium: an analysis of cytokeratin 20, p53, and CD44 antigens. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25(8): 1074-1078
51. Milea AL, George S, Berman HK, Gauthier ML, Shaw PA. The role of the retinoblastoma pathway (Rb) in high grade serous ovarian carcinoma (HGSC). *Cancer Research.* 2011; 71(8): 333
52. Mingels MJ, Roelofsen T, Laak JAvd, Hullu JAd, Ham MAv, Massuger LF, Bulten J, Bol M. Tubal epithelial lesions in salpingo-oophorectomy specimens of BRCA-mutationcarriers and controls. *Gynecol Oncol.* 2012; 127(1): 88-93
53. Miron PJ. beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays.* 1999; 21(12): 1021-1030

54. Moorman PG, Havrilesky LJ, Gierisch JM, Coeytaux RR, Lowery WJ, Urrutia RP, Dinan M, Mc Broom AJ, Hasselblad V, Sanders GD, Myers ER. Oral contraceptives and risk of ovarian cancer and breast cancer among high-risk women: a systematic review and meta-analysis.
<http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2013.48.9021>,
abgerufen am 26.11.2016
55. NCBI. Lef1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51176>. abgerufen am 20.11.2016
56. Nichols KE, Malkin D, Garber JE, Fraumeni JF, Li FP. Germline p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev.* 2001; 10(2): 82-87
57. Noll S, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie.*
1. Auflage, Urban und Fischer-Verlag, München 2000; 147
58. Novak M, Lester J, Karst AM, Parkash V, Hirsch MS, Crum CP, Kalan BY, Drapkin R. Stathmin 1 and p16(INK4A) are sensitive adjunct biomarkers of serous tubal intraepithelial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2015; 139: 104-111
59. O'Neill CJ, Mc Bridge HA, Connolly LE, Deavers MT, Malpica A, Mc Cluggage WG. High-grade ovarian serous carcinoma exhibits significantly higher p16 expression than low-grade serous carcinoma and serous borderline tumour. *Histopathology.* 2007; 50: 773-779
60. Oczan A, Liles N, Coffey D, Shen SS, Truong LD. PAX2 and PAX8 expression in primary and metastatic müllerian epithelial tumors: a comprehensive comparison. *Am J Surg Pathol.* 2011; 35(12): 1837-1847
61. Ordonez NG. Desmoplastic small round cell tumor. I: A histopathologic study of 39 cases with emphasis on unusual histologic patterns. *Am J Surg Pathol.* 1998; 22: 1303-1313
62. Ozcan A, Steven SS, Hamilton C, Anjana K, Coffey D, Krishnan B, Truong LD. PAX8 expression in non-neoplastic tissues, primary tumors, and metastatic tumors: a comprehensive immunohistochemical study. *Mod Pathol.* 2011; 24: 751-764
63. PathologyOulines.com. P53.
<http://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsp53.html>, abgerufen am 12.12.2016

64. PathologyOutlines.com. PAX2.
<http://www.pathologyoutlines.com/topic/stainspax2.html>,
abgerufen am 09.12.2016
65. Patricio P, Ramahho-Carvalho J, Costa-Pinheiro P, Almeida M, Barros-Silva JD, Vieira J, Dias PC, Labo F, Oliveira J, Texeira MR, Henrique R, Jeronimo C.
Deregulation of PAX2 expression in renal cell tumours: mechanisms and potential use in differential diagnosis. *J Cell Mol Med*. 2013; 17(8): 1048-1058
66. Pavone ME, Hirshfeld-Cryton J, Tingen C, Thomas C, Thomas J, Lowe MP, Schink JC, Woodruff TK. Human ovarian tissue cortex surrounding benign and malignant lesions. *Reproductive Sciences*. 2014; 2(5): 582-589
67. Petrucelli N, Daly MB, Feldmann GL. BRCA1 and BRCA2 Hereditary Breast and Ovarian Cancer. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247>,
abgerufen am 25.11.2016
68. Poleev A, Fickenscher H, Mundlos S, Winterpracht A, Zabel B, Fidler A, Gruss P, Plachov D. PAX8, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms`tumors. *Development*. 1992; 116: 611-623
69. Prat J, Cao D, Carinelli SG, Nogales FF, Vang R, Zaludek CJ. Germ cell tumours. 4. Auflage, International Agency for Research on Cancer, Lyon 2014; 57-62
70. Rask K, Nilsson A, Brännström M, Carlsson P, Hellberg P, Janson PO, Hedin L, Sundfeldt K. Wnt-signalling pathway in ovarian epithelial tumours: increased expression of beta-catenin and GSK3beta. *Br J Cancer*. 2003; 89: 1298-1304
71. Remmele W, Bässler R, Böcker W, Dallenbach-Hellung G, Dietel M, Harms, Klöppel G, Müntefering H, Podleck J, Saeger W, Schmid J, Schmidt D, Vogel M. Pathologie Band 4. Weibliches Genitale; Mamma; Pathologie der Schwangerschaft, der Plazenta und des Neugeborenen; Infektionskrankheiten des Fetus und des Neugeborenen; Tumoren des Kindesalters; Endokrine Organe. 2. Auflage, Springer Verlag Berlin 1997; 92-101
72. Robert-Koch-Institut (RKI) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID). Krebs in Deutschland 2013/2014. 11. Ausgabe, Robert-Koch-Institut, Berlin 2017.
73. Russo A, Calo V, Bruno L, Rizzo S, Bazan V, Fede Gd. Hereditary ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009; 69: 28-44

74. Salinas E, Parks S, Goodheart M. lymphoid enhancer-binding factor 1 is upregulated in adenocarcinomas of gynecologic and non-gynecologic origin. *Gynecol Oncol.* 2016; 143(1): 194-223
75. Schindlbeck C, Hantschmann P, Zerzer M, Jahns B, Rjosk D, Janni W, Rack B, Sommer H, Friese K. Prognostic impact of KI67, p53, human epithelial growth factor receptor, and nm23 expression of ovarian carcinomas and disseminated tumor cells in the bone marrow. *Int J Gynecol Cancer.* 2007; 17: 1047-1055
76. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182(3): 311-322
77. Scully RE, Sobin LH. Histological typing of ovarian tumours. 2. Ausgabe, Springer-Verlag, Berlin 1999; 3-9
78. Song H, Kwan SY, Izaguirre DI, Zu Z, Tsang YT, Tung CS, King ER, Mok SK, Gershenson DM, Wong KK. PAX2 expression in ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(3): 6090-6105
79. Takeda T, Banno K, Okawa R, Yanokura M, Iijima M, Irie-Kunitomi H, Nakamura K, Iida M, Adachi M, Umene K, Nogami Y, Masuda K, Kobayashi Y, Tominaga E, Aoki D. ARID1A gene mutation in ovarian and endometrial cancers. *Oncol Rep.* 2016; 35: 607-613
80. Tan DS, Miller RE, Kaye SB. New perspectives on molecular targeted therapy in ovarian clear cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2013; 108(8): 1553-1559
81. Tan DS, Rothermundt C, Thomas K, Bancroft E, Eeles R, Shanley S, Arderin-Jones A, Norman A, Kaye SB, Gore ME. "BRCAness" syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Clin Oncol.* 2008; 26(34): 5530-5536
82. Tong GX, Chiriboga L, Hamele-Bena D, Borczuk AC. Expression of PAX2 in papillary serous carcinoma of the ovary: immunohistochemical evidence of fallopian tube or secondary Müllerian system origin? *Mod Pathol.* 2007; 20: 856-563
83. Tong SY, Lee YS, Park JS, Bae SN, Lee JM, Namkoong SE. Clinical analysis of synchronous primary neoplasms of the female reproductive tract. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 2008; 136: 78-82

84. Travis A. LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with a HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function. *Genes Dev.* 1991; 5: 880-894
85. Tresserra F, Grases PJ, Labastida R, Ubeda A. Histological features of the contralateral ovary in patients with unilateral ovarian cancer: a case control study. *Gynecol Oncol.* 1998; 71: 437-441
86. Tumorregister München (TMR). Tumorspezifische Analysen. <http://www.tumorregister-muenchen.de>, abgerufen am 07.10.2016
87. Tumorzentrum München. Tumormanual 2010, Maligne Ovarialtumoren. 10. Auflage, W. Zuckschwerdt Verlag, München 2014; 1-35
88. Uni Basel, Pathopic. High-grade seröses Ovarialkarzinom. <http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/getpic-fra.cfm?id=010936>, abgerufen am 03.02.2017
89. Uni Basel, Pathopic. Seröser Borderline-Tumor des Ovars. <http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/getpic-fra.cfm?id=010926>, abgerufen am 03.02.2017
90. Venkitaraman AR. Tracing the network connecting BRCA and Fanconi anaemia proteins. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(4): 266-276
91. Werness BA, Afify AM, Bielat KL, Eltabbakh GH, Priver MS, Paterson JM. Altered surface and cyst epithelium of ovaries removed prophylactically from women with a family history of ovarian cancer. *Hum Pathol.* 1999; 30: 151-157
92. Weyerstahl T, Stauber M. Gynäkologie und Geburtshilfe. 4. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart 2013; 267-293
93. Whitmore AS, Harris R, Itnyne J and the Collaborative Ovarian Cancer Group. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies: II. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. *Am J Epidemiol.* 1992; 136(10): 1184-1203
94. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, Senz J, McConchy MK, Anglesio MS, et al. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *New England Journal Medicine.* 2010; 363: 1532-1543
95. Wiseman W, Michael CW, Roh MH. Diagnostic utility of PAX8 and PAX2 immunohistochemistry in the identification of metastatic Müllerian carcinoma in effusions. *Diagn Cytopathol.* 2011; 39(9): 651-656

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Katrin Hecker, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Histomorphologische und immunhistochemische Untersuchungen an Adnexektomiepräparaten von BRCA1- und BRCA2-Keimbahnmutationsträgerinnen: Können Vorläuferläsionen ovarieller Tumoren nachgewiesen werden?“

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines Akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 05.09.2018

Ort, Datum

Katrin Hecker

Unterschrift Doktorandin